

**Wirkung von Transaminaseinhibitoren auf die
Tryptophan-abhängige Pigmentbildung von
*Malassezia furfur***

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Inga Susanne Gabriele Vöhrs geb. Rieche

aus Stuttgart

Gießen 2010

Aus dem Zentrum für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen.

Leiter: Prof. Dr. med. M. Goebeler

Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Mayser

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Roswitha Füssle

Tag der Disputation: 24.November 2010

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Publikation

Rapid reversal of hyperpigmentation in pityriasis versicolor upon short-term topical cycloserine application.

Mayser, P., Rieche, I.

Mycoses. 2009 Nov; 52(6): 541-3. Epub 2009 Sep 22.

Vortrag

Inhibitors of transaminase 1: a new therapeutic approach to pityriasis versicolor?

P. Mayser, I. Rieche and S. Lang;

Vortrag auf der 43. Tagung der Deutschsprachigen mykologischen Gesellschaft in Köln; 05.09.2009; Abst. Mycoses 52; 401 (Abst.), 2009.

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNG.....	22
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	ANZUCHT UND KULTUR VON MALASSEZIA FURFUR	23
3.2	VERWENDETE NÄHRMEDIEN	23
3.2.1	Dixon-Agar	23
3.2.2	Pigmentinduktionsmedium (P-Agar)	24
3.2.3	Modifiziertes Pigmentinduktionsmedium	25
3.2.4	Minimal-Flüssignährmedium.....	26
3.3	PROBENENTNAHME	29
3.4	PHOTOMETRISCHE METHODE ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DES PIGMENTS.....	29
3.5	AGARDIFFUSIONSTEST	30
3.6	SCREENING - DIE SUCHE NACH EINEM HEMMSTOFF	30
3.7	VORVERSUCHE MIT 12-WELL-PLATTEN.....	32
3.8	PLATTENVERDÜNNUNGSTEST.....	32
3.9	FÜTTERVERSUCH MIT TRYPTOPHAN	33
3.10	AUSSTREICHEN DES PILZES AUS DEM HEMMHOF	33
3.11	HEILVERSUCH MIT CYCLOSERIN.....	34
4	ERGEBNISSE	37
4.1	SCREENING - DIE SUCHE NACH EINEM HEMMSTOFF	37
4.2	AUSSTREICHEN DES PILZES AUS DEM HEMMHOF	37
4.3	FÜTTERVERSUCH MIT TRYPTOPHAN	38
4.4	ERGEBNISSE AMINOXYACETAT	39
4.4.1	Agardiffusionstest.....	39
4.4.2	Plattenverdünnungstest.....	41

4.4.3	Test im Flüssigmedium	42
4.5	ERGEBNISSE CYCLOSERIN	44
4.5.1	Agardiffusionstest.....	44
4.5.2	Plattenverdünnungstest.....	46
4.5.3	Test im Flüssigmedium	47
4.6	ERGEBNISSE HOMOSERIN.....	50
4.6.1	Agardiffusionstest.....	50
4.6.2	Plattenverdünnungstest.....	51
4.7	ERGEBNISSE TERIZIDON	53
4.7.1	Vorversuch mit 12-Well-Platte.....	53
4.7.2	Agardiffusionstest.....	55
4.7.3	Plattenverdünnungstest.....	56
4.8	ANWENDUNGSVERSUCHE MIT CYCLOSERIN	58
4.9	AGARDIFFUSIONSTEST MIT ANDEREN MALASSEZIA STÄMMEN	82
4.10	AGARDIFFUSIONSTEST MIT VERSCHIEDENEN CANDIDA STÄMMEN.....	84
5	DISKUSSION	89
6	ZUSAMMENFASSUNG	99
7	SUMMARY	102
8	LITERATUR	105
9	ANHANG	113
9.1	ROHDATEN	113
9.2	EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG	115
9.3	DOKUMENTATIONSBOGEN.....	116
9.4	PATIENTENTAGEBUCH.....	120
10	LEBENS LAUF	121
11	DANKSAGUNG.....	122

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1:	FARB-SPEKTRUM IN DER SPEKTRALPHOTOMETRIE	19
TABELLE 2:	MENGEN UND SUBSTANZEN ZUR HERSTELLUNG VON DIXON-AGAR.....	24
TABELLE 3:	MENGEN UND SUBSTANZEN ZUR HERSTELLUNG VON PIGMENTINDUKTIONSMEDIUM	25
TABELLE 4:	MENGEN UND SUBSTANZEN ZUR HERSTELLUNG VON MODIFIZIERTEM PIGMENTINDUKTIONSMEDIUM	26
TABELLE 5:	MENGEN UND SUBSTANZEN DES MINIMAL-FLÜSSIGNÄHRMEDIUMS.....	27
TABELLE 6:	GETESTETE SUBSTANZEN.....	31
TABELLE 7:	MENGEN UND SUBSTANZEN DER CYCLOSERIN-LÖSUNG	35
TABELLE 8:	PROBANDEN - ANAMNESTISCHE DATEN	36
TABELLE 9:	KONZENTRATIONEN AMINOXYACETAT	41
TABELLE 10:	KONZENTRATIONEN HOMOSERIN	52
TABELLE 11:	KONZENTRATIONEN TERIZIDON (VORVERSUCH)	54
TABELLE 12:	KONZENTRATIONEN TERIZIDON.....	57
TABELLE 13:	AGARDIFFUSIONSTEST MIT ANDEREN MALASSEZIA STÄMMEN	82
TABELLE 14:	AGARDIFFUSIONSTEST MIT VERSCHIEDENEN CANDIDA STÄMMEN	85

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: VERTEILUNG DER MALASSEZIA-HEFEN AUF DER HAUTOBERFLÄCHE.....	2
ABBILDUNG 2: HOBELSPANPHÄNOMEN, KLINISCHES BILD	3
ABBILDUNG 3: NATIVPRÄPARAT: UNVERZWEIGTE HYPHEN NEBEN RUNDEN HEFEZELLEN	6
ABBILDUNG 4: WOODLICHT: GELBLICH-GRÜNE FLUORESCENZ.	7
ABBILDUNG 5: HYPERPIGMENTIERUNG DER PITYRIASIS VERSICOLOR.	8
ABBILDUNG 6: PITYRIASIS VERSICOLOR ALBA, DEPIGMENTIERTE AREALE AUF DUNKLER HAUT.	9
ABBILDUNG 7: METHIONIN STOFFWECHSEL.....	16
ABBILDUNG 8: FÜTTERVERSUCH MIT HOMOSERIN (1M).....	38
ABBILDUNG 9: AGARDIFFUSIONSTEST AUF P-AGAR MIT AMINOOXYACETAT.....	39
ABBILDUNG 10:AGARDIFFUSIONSTEST AUF DIXON-AGAR MIT AMINOOXYACETAT.....	40
ABBILDUNG 11:PLATTENVERDÜNNUNGSTEST MIT AMINOOXYACETAT.	41
ABBILDUNG 12:FLÜSSIGMEDIUMVERSUCH MIT AMINOOXYACETAT	42
ABBILDUNG 13:EINZELWELLENLÄNGENSCAN BEI 600Å. AMINOOXYACETAT: 0,2 MOLAR.....	42
ABBILDUNG 14:AGARDIFFUSIONSTEST AUF P-AGAR MIT L-CYCLOSERIN.	44
ABBILDUNG 15:AGARDIFFUSIONSTEST AUF P-AGAR MIT D-CYCLOSERIN.	44
ABBILDUNG 16:AGARDIFFUSIONSTEST AUF DIXON-AGAR MIT D-CYCLOSERIN.	45
ABBILDUNG 17:PLATTENVERDÜNNUNGSTEST MIT CYCLOSERIN.	46
ABBILDUNG 18:1. FLÜSSIGMEDIUMVERSUCH MIT CYCLOSERIN.	47
ABBILDUNG 19:EINZELWELLENLÄNGENSCAN BEI 600Å. CYCLOSERIN : 0,2 M.....	47
ABBILDUNG 20:2. FLÜSSIGMEDIUMVERSUCH MIT CYCLOSERIN.	48
ABBILDUNG 21:EINZELWELLENLÄNGENSCAN BEI 600Å. CYCLOSERIN: 0,2 M.....	48
ABBILDUNG 22:AGARDIFFUSIONSTEST MIT HOMOSERIN.	50
ABBILDUNG 23:AGARDIFFUSIONSTEST MIT HOMOSERIN (1 M).	51
ABBILDUNG 24:PLATTENVERDÜNNUNGSTEST MIT HOMOSERIN.	52
ABBILDUNG 25:VORVERSUCH MIT TERIZIDON.....	53
ABBILDUNG 26:VORVERSUCH MIT TERIZIDON, 22 TAGE ALT.....	53
ABBILDUNG 27:AGARDIFFUSIONSTEST AUF P-AGAR MIT TERIZIDON.	55
ABBILDUNG 28:AGARDIFFUSIONSTEST AUF DIXON-AGAR MIT TERIZIDON.	56
ABBILDUNG 29:PLATTENVERDÜNNUNGSTEST MIT TERIZIDON.....	57
ABBILDUNG 30:PATIENT 1, VOR DER THERAPIE.....	59

ABBILDUNG 31: PATIENT 1, NACH DER THERAPIE.....	60
ABBILDUNG 32: PATIENT 1, PATIENTENTAGEBUCH.....	61
ABBILDUNG 33: PATIENT 2, VOR DER THERAPIE. AUSGEDEHNTE PV ALBA.	62
ABBILDUNG 34: PATIENT 2, NACH FÜNFTÄGIGER THERAPIE.....	63
ABBILDUNG 35: PATIENT 3, NATIVPRÄPARAT.	64
ABBILDUNG 36: PATIENT 3, RECHTE SCHULTER DES PATIENTEN VOR DER THERAPIE.....	65
ABBILDUNG 37: PATIENT 3, PATIENTENTAGEBUCH.....	66
ABBILDUNG 38: PATIENT 3, RECHTE SCHULTER DES PATIENTEN NACH DER THERAPIE.....	67
ABBILDUNG 39: PATIENT 3, VERGLEICH IM DETAIL.....	68
ABBILDUNG 40: PATIENT 3, AGARDIFFUSIONSTEST.....	68
ABBILDUNG 41: PATIENT 4, VOR DER BEHANDLUNG.....	69
ABBILDUNG 42: PATIENT 4, NACH DER BEHANDLUNG.....	70
ABBILDUNG 43: PATIENT 4, PATIENTENTAGEBUCH.....	71
ABBILDUNG 44: PATIENT 5, LINKE KÖRPERSEITE VOR DER BEHANDLUNG.....	72
ABBILDUNG 45: PATIENT 5, LINKE KÖRPERSEITE NACH DER BEHANDLUNG.	73
ABBILDUNG 46: PATIENT 5, RECHTE KÖRPERSEITE - VOR DER THERAPIE.....	74
ABBILDUNG 47: PATIENT 5, RECHTE KÖRPERSEITE - NACH DER THERAPIE.....	75
ABBILDUNG 48: PATIENT 5, PATIENTENTAGEBUCH.....	76
ABBILDUNG 49: PATIENT 6, VOR DER BEHANDLUNG.....	77
ABBILDUNG 50: PATIENT 6, NACH DER BEHANDLUNG.	78
ABBILDUNG 51: PATIENT 6, DETAILANSICHTEN - VOR UND NACH DER THERAPIE.	78
ABBILDUNG 52: PATIENT 6, PATIENTENTAGEBUCH.....	79
ABBILDUNG 53: PATIENT 7, VOR DER BEHANDLUNG.....	80
ABBILDUNG 54: PATIENT 7, NACH DER BEHANDLUNG.	81

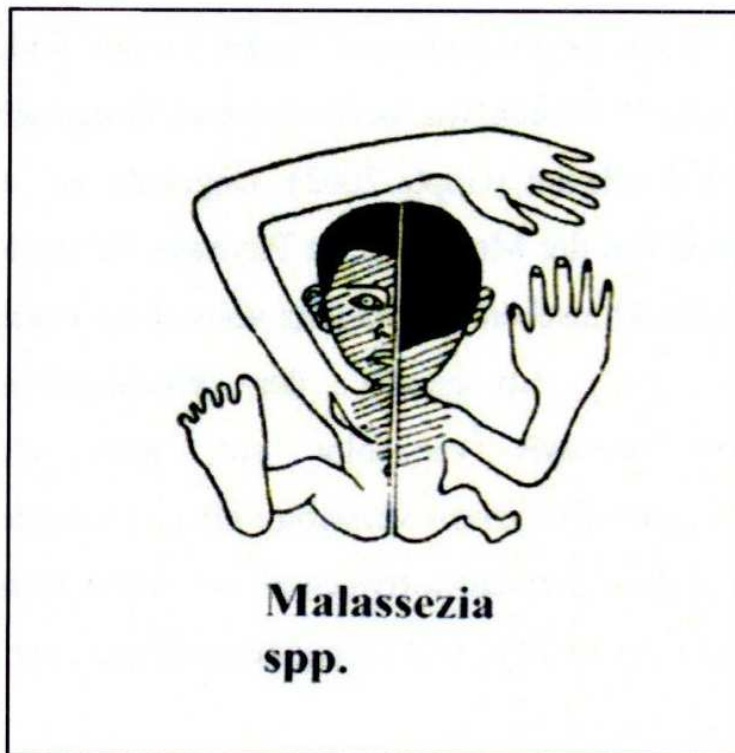
Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mykroliter
Abb.	Abbildung
Aq.dest.	Aqua destillata
C.	Candida
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
g	Gramm
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
M	Molarität = Mol pro Liter
M.	Malassezia
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	MilliMol
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
PV	Pityriasis versicolor
TAM 1	Tryptophan-Aminotransferase 1
TRP	Tryptophan

1 EINLEITUNG

Pityriasis versicolor

Eine der häufigsten Pilzerkrankungen des Menschen ist die Pityriasis versicolor (PV), auch Kleienflechte genannt. Sie wird hervorgerufen durch Hefepilze der Gattung *Malassezia* (anderer Name: *Pityrosporum ovale*, *Pityrosporum orbiculare*), unter anderem auch durch *Malassezia furfur*. *Malassezia*-Hefen gehören zur normalen Hautflora des Menschen und vieler anderer Warmblüter. Eichstedt entdeckte 1846 als erster den Zusammenhang von *Malassezia*-Hefen mit der Pityriasis versicolor (Eichstedt, 1846). Die Ursachen für die pathogene Wirkung bei manchen Menschen sind nicht vollständig geklärt (Gupta et al., 2003). Bei entsprechender Disposition, oft zusammen mit starkem Schwitzen kann sich der Pilz vermehren; Pilzfäden, sogenannte Hyphen ausbilden und die Erkrankung auslösen. Die Erkrankung ist durch schuppige hyper- oder hypopigmentierte Läsionen gekennzeichnet, die trotz hoher Pilzlast keine oder nur eine geringe entzündliche Aktivität aufweist. Die Läsionen zeigen eine charakteristische gelb-grünliche Fluoreszenz unter ultraviolettem Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm (Mayser et al., 1998). Klinisch imponieren hell- bis dunkelbraune, z. T. erythematöse Maculae, die bevorzugt in den talgdrüsenreichen Arealen des Körpers, wie z. B. im Nacken, auf der Brust und auf dem Rücken zu finden sind. Sie treten aber auch auf den Armen und im Gesicht auf, vor allem an der Stirn (Terragni et al., 1991). Hände, Füße und Ohren sind sehr selten befallen (Ruete, 1928; Roberts, 1969; Chetty et al., 1979).



Quelle: Fritsch, Dermatologie Venerologie, 2. Aufl. 2004, Springer Medizin Verlag, Heidelberg

Abbildung 1: Verteilung der Malassezia-Hefen auf der Hautoberfläche.
Schwarz: sehr dichte Besiedlung, Schraffur: dichte Besiedlung

Die Pilzherde sind zunächst linsen- bis pfenniggroß und neigen zu landkartenartiger Konfluenz. Beim Streichen über die Läsionen mit einem Holzspatel imponiert eine feine, kleieartige (pityriasiforme) Schuppung, die auch als „Hobelspanphänomen“ bekannt ist. Unter ultravioletter Bestrahlung oder an bedeckten Körperstellen kann die Hyperpigmentierung im Laufe der Erkrankung in depigmentierte, nicht oder nur gering schuppende Areale übergehen. In diesen ist die Melaninsynthese lang anhaltend eingeschränkt (Pityriasis versicolor alba) und die Repigmentierung kann einige Monate andauern. Abgesehen von diesen oft sehr störenden kosmetischen Aspekten sind die Patienten nicht beeinträchtigt, gelegentlich wird bei stärkerem

Schwitzen leichter Juckreiz beschrieben. Die PV alba zeichnet sich besonders durch extreme Therapieresistenz aus (Thoma et al., 2005).

Die Pathogenese der hypopigmentierten Form (PV alba) ist noch nicht ganz geklärt. Nazarro et al. sehen die Ursache in Stoffwechselprodukten von Pilzen, die einen toxischen Effekt auf die Melanozyten haben. Mögliche Toxine sind z.B. Dicarbonsäuren wie Azelainsäure (Nazzaro et al., 1986) und Lipoperoxydase (de Luca et al., 1996).



Quelle: P. Mayser

Abbildung 2: Hobelspanphänomen, klinisches Bild

Betroffen von der PV sind vor allem jüngere Menschen in der 2. und 3. Lebensdekade (Parisis et al., 1977; Chetty et al., 1979; Seeliger et al., 1981). Nach dem 60. Lebensjahr und bei Kindern ist die Inzidenz deutlich geringer. Mit Ausnahme der Tropen findet sich die Erkrankung selten bei Kindern unter 10 Jahren, da die Veränderung der Hautlipide in der Pubertät für die Erkrankung bedeutsam ist. Eine Geschlechtspräferenz besteht nicht. (Jeliffe, 1954; Smith et al., 1966; Wyre et al., 1981; Ahtonen et al., 1990; Jena et al., 2005; Sellami et al., 2008). Der Einfluss des Klimas ist in mehreren Studien belegt worden. In tropischen bis subtropischen Regionen ist laut Borelli etwa jeder Zweite erkrankt (Borelli et al., 1991). Eine Studie mit über 800 Schulkindern aus Tansania zeigte eine Prävalenz von 26 % (Ferié et al., 2006), eine Studie in Nigeria mit 1415 Schülern 22% (Ogunbiyi et al., 2009). Eine an Fischern aus Venezuela durchgeführte Untersuchung wies eine Prävalenz von 15,52 % auf (Acosta et al., 2004).

In Nord- und Mitteleuropa hat Pityriasis versicolor hingegen eine Prävalenz von 0,5 – 1 % mit einem Maximum in den Monaten Mai bis September (Parisis et al., 1977). Eine Studie aus Schweden an einer Gruppe von 20 296 Patienten, zeigte eine Prävalenz von 1,1 % (Hellgren et al., 1983). Eine weitere Studie aus Europa an 1024 jungen Seglern italienischer Herkunft ergab eine Prävalenz von 2,1 %; es gab hier keinen Zusammenhang zwischen der Erkrankung und dem Segeln, Schwimmen oder einer übermäßigen Schweißabsonderung (Ingordo et al., 2003).

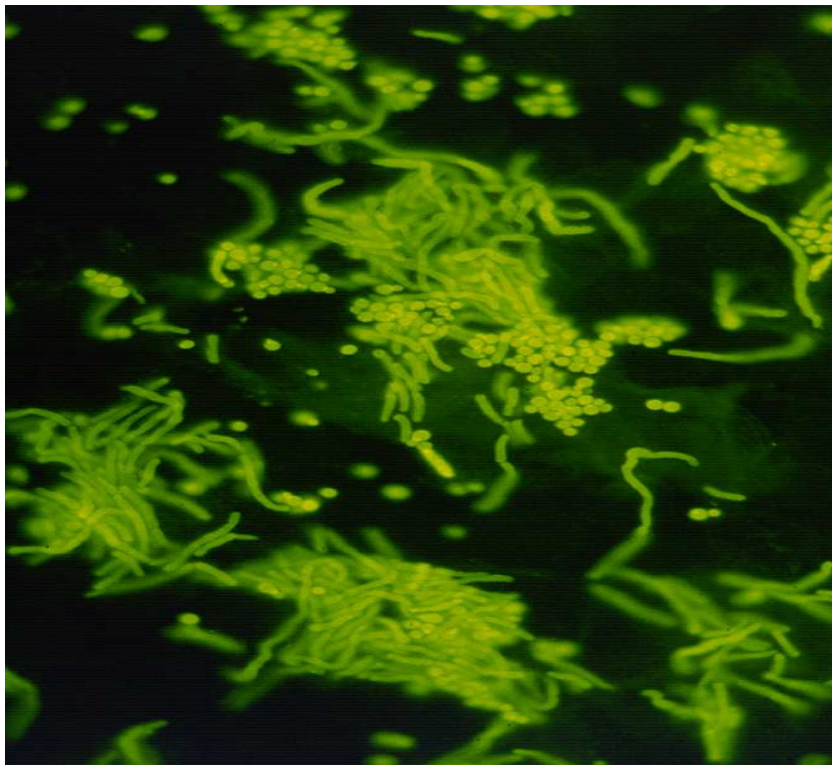
Eine Kontagiosität gilt als gering oder nicht gegeben; ein epidemisches Auftreten bzw. Partnerinfektionen wurden bisher nur selten beschrieben. In Familien tritt die Erkrankung häufiger bei Blutsverwandten auf (Roberts, 1969; El-Hefnawi et al., 1971). Zwillingsbeobachtungen (Lynfield, 1974) lassen genetische Einflüsse wahrscheinlich erscheinen. Zu den Prädispositionsfaktoren zählen neben tropisch-feuchtwarmem Makroklima,

auch die individuelle Neigung zum Schwitzen z. B. bei Hyperthyreose, Tuberkulose, Malignomen (Razack et al., 1977), Malnutrition (Burke, 1961; Noble, 1981), und die Anwendung lipidhaltiger Externa (Marples, 1965). Auch Einflüsse des Mikroklimas, d.h. Okklusion der Kleidung, zeigen einen deutlichen Einfluß auf das Krankheitsbild (Hay et al., 1992). Gegen eine maßgebliche pathogenetische Bedeutung einer Immunsuppression spricht die unveränderte Inzidenz bei gleichzeitiger Erkrankung an Diabetes mellitus oder AIDS (García-Humbría et al., 2005).

Die Diagnosestellung „Pityriasis versicolor“ erfolgt in den meisten Fällen klinisch. Sie wird ergänzt durch eine Wood-Licht-Untersuchung (gelblich-grüne Fluoreszenz) und ein Nativpräparat. Mikroskopisch finden sich in den Schuppen sehr charakteristische, kurze z. T. fragmentierte und unverzweigte Hyphen neben runden Hefezellen. Dieses typische Bild wird auch als „Spaghetti und Fleischklößchen“ bezeichnet. Auf das Anlegen einer Pilzkultur kann verzichtet werden, da der Erreger zur residenten Keimflora der menschlichen Haut gehört.

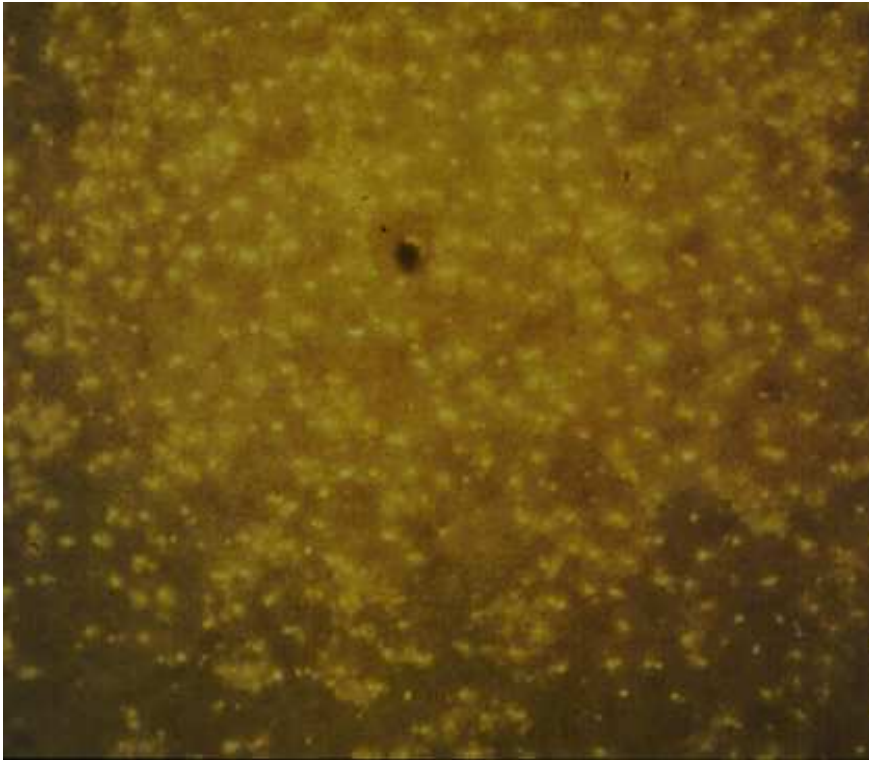
2006 publizierten Crespo-Erchiga und Delagdo eine Arbeit, in der etwa hundert Patienten mit Pityriasis versicolor aus drei verschiedenen Krankenhäusern in Spanien untersucht wurden. In 97 % der Fälle wurde *Malassezia globosa* isoliert, gefolgt von *Malassezia sympodialis* (34 %), *Malassezia sloofiae* (3 %), *Malassezia furfur* (2 %) und *Malassezia restricta* (1 %). Eine Studie aus Argentinien zeigte ebenfalls ein hohes Vorkommen von *Malassezia sympodialis* (37,7%) und *Malassezia globosa* (37,2%) (Giusiano et al., 2010).

In anderen Untersuchungen, die vor allem in den Tropen bzw. Subtropen durchgeführt wurden, dominierte *Malassezia furfur* in den PV-Läsionen. In Brasilien wurde *Malassezia furfur* in 77,8 % der Fälle (Miranda et al., 2006), in Madagaskar in 70,7 % (Razanacolona et al., 2004) und in Panama in 42 % (de Quinzada, 2005) festgestellt. Diese Studien zeigen den Einfluss des Klimas auf die Dominanz verschiedener *Malassezia* Stämme.



Quelle: P. Mayser

Abbildung 3: Nativpräparat: unverzweigte Hyphen neben runden Hefezellen
(Uvitex 2b Färbung).



Quelle: P. Mayser

Abbildung 4: Woodlicht: gelblich-grüne Fluoreszenz.

Therapie

Die Krankheit ist insgesamt gut behandelbar, neigt aber stark zu einem rezidivierenden Verlauf. Zu den Allgemeinmaßnahmen der Behandlung zählen häufiges Baden oder Duschen unter Verwendung von synthetischen Detergenzien (Syndets), die Vermeidung von Kleidung mit Okklusiveffekt und das Ausschalten von weiteren Triggerfaktoren. Topisch wirksam sind Antimykotika aus der Gruppe der Azole, wie Miconazol, Econazol, Clotrimazol, Bifonazol, Ketoconazol, Sulconazol, und Tioconazol (Katsambas et al., 1996; Mellen et al., 2004; Svejgaard, 1973; Tanenbaum, 1984). Diese sind als Crème, Lotion, Gel, Puder und Shampoo erhältlich. Alternativ kann eine

Mischung aus 50 % Propylenglycol in Wasser verwendet werden (Faergemann et al., 1980). Diese Substanz wird auch in der Langzeittherapie eingesetzt, um einem Rezidiv vorzubeugen. Daneben sind aber auch klassische Therapeutika wie Natriumthiosulfat, Pyrithion-Zink, Schwefel und Selendisulfid wirksam. Topisch sollte immer der gesamte Körper behandelt werden, wirkstoffhaltige Shampoos oder Lösungen sind deshalb besonders gut geeignet. Bei ausgedehnten Herden und häufigen Rezidiven ist die systemische Therapie indiziert. Zur Verfügung stehen verschiedene Azole: Itraconazol, Fluconazol und Ketoconazol. Letzteres ist in Deutschland nicht mehr verfügbar. Die ideale Behandlungsdosis für Itraconazol liegt bei 800 – 1000 mg insgesamt, verteilt über 4 – 5 Tage mit je 200 mg (Delescluse, 1990). Fluconazol wird normalerweise über 5 – 7 Tage eingesetzt. Es gibt Beobachtungen, dass eine einzelne Dosis Fluconazol (200 mg) eine deutlich bessere Heilungsrate (65 %) besitzt als eine Einzeldosis Itraconazol (Farschian et al., 2002).



Quelle: P. Mayser

Abbildung 5: Hyperpigmentierung der Pityriasis versicolor.



Quelle: P. Mayser

Abbildung 6: Pityriasis versicolor alba, depigmentierte Areale auf dunkler Haut.

Malassezia furfur

Malassezia furfur gehört zu der Gattung der *Malassezia* Hefen. Dieser Pilz wird zu den „fungi imperfecti“ gezählt, da ein perfektes Stadium bisher nicht bekannt ist (Seeliger et al., 1981; Horner et al., 1995). Er kann aber auch zu den Basidiomyceten (Ständerpilze) gerechnet werden, da bei ihm ein lamellenartiger Aufbau der Zellhülle und eine positive Diazoniumblau-B-Färbereaktion vorliegt (Hagler et al., 1981; Nenoff et al., 2001).

Mikromorphologisch lassen sich unter dem Lichtmikroskop bei *Malassezia furfur* runde, ovale und zylindrische Formen unterscheiden, die unterschiedliche Längen und Durchmesser aufweisen (Ruete, 1928). Die Zellgröße reicht von 1,5 – 4,5 x 2,0 - 6,5 µm Durchmesser (Yarrow et al., 1984). Die etwa 120 nm dicke Zellwand mit spiraligem Aufbau (Mittag, 1994, 1995) besteht aus einer Außenlamelle, einer mehrschichtigen, multilamellös untergliederten Zwischenwand und der Plasmamembran. Man vermutet, dass

der Lipidgehalt der Außenlamelle die Adhärenzprozesse von *Malassezia furfur* begünstigt (Mittag, 1994, 1995). Die Vermehrung des Pilzes erfolgt durch die Abschnürung der Tochterzellen von der Elternzelle unter Hinterlassung einer halskrausenartigen Narbe, der sogenannten „Collarette“ (Barnes et al., 1973; Yarrow et al., 1984).

Malassezia furfur ist in der Lage eine Reihe komplexer Indolverbindungen zu bilden, wenn Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle angeboten wird. Dies scheint bedeutsam in der Pathogenese der PV, da diese Indolverbindungen interessante biologische Wirkungen aufweisen:

- Malassezin, der erste offenkettige Agonist des Aryl Hydrocarbon Rezeptors (AHR), bewirkt eine dosis-abhängige Apoptose in menschlichen Melanozyten und könnte auf diese Weise zur Depigmentierung beitragen.
- Pityriacitrin mit seinen UV-protectiven Eigenschaften könnte begründen, warum in den depigmentierten Arealen keine erhöhte UV-Empfindlichkeit auftritt.

Eine Erklärung für die geringe entzündliche Aktivität in den Läsionen – trotz hoher Pilzlast – stellen die Pityriarubine A, B und C als Hemmstoffe des granulozytären Bursts dar. Die diagnostisch nutzbare Fluoreszenz der Läsionen könnte durch das Fluorochrom Pityrialacton verursacht werden (Mayser et al., 2008).

Die UV-protective Wirkung von Pityriacitrin, könnte möglicherweise auch eine Erklärung für die Beobachtung liefern, dass in den depigmentierten Arealen der PV alba, im Gegensatz zu anderen depigmentierenden Erkrankungen wie beispielsweise der Vitiligo, kein Sonnenbrand auftritt (de Almeida et al., 2006).

Untersuchungen an dem verwandten Organismus *Ustilago maydis* haben gezeigt, dass zur Biosynthese dieser Vielzahl komplexer Indolderivate aus Tryptophan nur ein einziger enzymatisch katalysierter Schritt notwendig ist (Zuther et al., 2008). Dieser Schritt, die Desaminierung von Tryptophan zu Indolpyruvat, wird in *Ustilago maydis* von der Tryptophan-Aminotransferase (TAM 1) katalysiert. Dies zeigt, dass die TAM 1 aus *Malassezia furfur* für die tryptophanabhängige Pigmentbildung verantwortlich ist.

Pigment

Unter Pigment versteht man einen in Zellen und Geweben gelösten oder in Körnchenform vorkommenden Stoff mit Eigenfarbe. Dieser Farbeindruck entsteht entweder durch Absorption oder Reflexion bestimmter Frequenzanteile des sichtbaren Lichts. Allerdings beschränkt sich die natürliche Funktion der Pigmente nicht nur auf die Farbgebung, sie ist auch mit vielen wichtigen metabolischen oder physiologischen Prozessen verknüpft. Beispiele hierzu sind das Hämoglobin als Sauerstoffträger, das Chlorophyll in der Photosynthese, antioxidative Pigmente in der humoralen Abwehr und im UV-Strahlenschutz (Britton, 1983).

Transaminasen

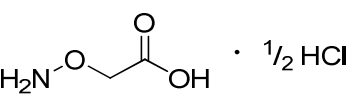
Transaminasen sind substratspezifische Enzyme, welche die Übertragung von Aminogruppen von einer Substanz auf eine andere katalysieren (Transaminierung). Üblicherweise handelt es sich bei dem Donormolekül um eine Aminosäure und bei dem Akzeptormolekül um eine α -Ketosäure, wobei aus der Aminosäure eine neue α -Ketosäure und aus der ursprünglichen α -Ketosäure eine neue Aminosäure wird.

Inhibitoren

Ein Inhibitor (lat.: inhibere = unterbinden, hemmen) ist ein Hemmstoff, also eine Substanz, die eine oder mehrere Reaktionen chemischer, biologischer oder physiologischer Natur so beeinflussen, dass diese verlangsamt, gehemmt oder verhindert werden.

Aminooxyacetat

IUPAC-Name: O-(Carboxymethyl)hydroxylamin Hemihydrochlorid

Strukturformel:  · 1/2 HCl

CAS-Nr.: 2921-14-4

Summenformel: C₂H₅NO₃ * 0.5 HCl

Molekulargewicht: 109.30 g/mol

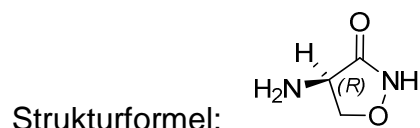
Bei Aminooxyacetat handelt es sich um ein Aminosäure-Analog. Der Begriff ‚analog‘ bezeichnet Verbindungen, die sich strukturell aus natürlichen Aminosäuren bzw. Zuckern herleiten lassen. Sie können die gleiche oder eine noch stärkere Modulation der Transaminase-Inhibition bzw. anderen Aktionen (z. B. Modulation des Glykolyse-Enzym-Komplexes) bewirken als die zugrunde liegende natürliche Substanz.

Aminooxyacetat hemmt die Glutamat-Pyruvat-Transaminase, die Glutamat-3-Hydroxypyruvat-Transaminase, die Ketocarbonsäure-Transaminasen und die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase. Einige Arbeitsgruppen setzten Aminooxyacetat in Studien ein. Bereits 1966 untersuchte eine Arbeitsgruppe den Zusammenhang von Aminooxyacetat und Gamma-Aminobuttersäure hinsichtlich der Blut-Hirn-Schranke (Fisher et al., 1966). Ipaktchi untersuchte

2005 den Einfluß von Aminoxyacetat auf die Proliferation von Novikoff-Hepatoma Tumorzellen. Am Ende des Versuches konnte gezeigt werden, dass die Tumorendvolumina nach der Injektion von Aminoxyacetat signifikant kleiner waren (Ipaktchi, 2005). Zeidler fand heraus, dass Aminoxyacetat und Cycloserin effektive Inhibitoren der Isoprenemission sind, der Wirkmechanismus ist aber noch unbekannt (Zeidler et al., 2001).

Cycloserin

IUPAC-Name: (R)-4-Amino-1,2-oxazolidin-3-on



CAS-Nr.: 68-41-7

Summenformel: $C_3H_6N_2O_2$

Molekulargewicht: 102.09 g/mol

D-Cycloserin ist ein bekanntes antituberkulöses Antibiotikum (Welch, 1955). Chemisch gesehen ist es eine heterocyclische organische Verbindung, die zu den Oxazolidinonen zählt.

Die Substanz ist ein Breitband-Antibiotikum und wird beispielsweise in den USA zur Behandlung von Tuberkulose eingesetzt. Es gilt als Mittel der zweiten Wahl und wird nur dann eingesetzt, wenn der Erreger gegen andere Antibiotika resistent ist. In Deutschland wird Cycloserin wegen seines hohen Nebenwirkungspotentials nicht als Medikament eingesetzt, sondern nur das Kondensationsprodukt Terizidon.

Cycloserin wird von verschiedenen Streptomyceten wie *Streptomyces garyphalus*, *Streptomyces orchidaceus* und *Streptomyces lavedulae* produziert, aus denen es durch Fermentation gewonnen werden kann. Cycloserin ist gut wasserlöslich (100 mg/ml) und mäßig löslich in Methanol. Es wird bei pH 7 und 37 °C nach sieben Tagen um 25 % und nach 14 Tagen um 38 % inaktiviert. Im alkalischen Bereich (pH 8 – 10) ist es stabiler als im neutralen oder sauren Bereich. Natriumcarbonat-gepufferte wässrige Lösungen (pH 10) sind bei + 4 °C etwa eine Woche stabil (Merck Index, 13. Edition 2001, Monographie 2780).

In der Behandlung der Tuberkulose wird das D-Enantiomer (D-Cycloserin) in Dosen von 0,5 g bis 1 g pro Tag (Erwachsene) verabreicht. Sein Wirkoptimum liegt bei einem pH-Wert von 6,4 bis 7,4. Gegen entsprechend empfindliche Stämme grampositiver und gramnegativer Bakterien sowie gegen *Mycobacterium tuberculosis* zeigt Cycloserin je nach Konzentration bakteriostatische oder bakterizide Wirkung. D-Cycloserin inhibiert sowohl die Alanin-Racemase als auch die D-Alanyl-D-Alanin-Synthetase, beides Enzyme, die für die Synthese der bakteriellen Zellwand essentiell sind. Das L-Enantiomer hemmt eine Reihe Vitamin B₆-abhängiger Enzyme und ist für den Menschen stärker toxisch (Wikipedia, Stand: 17.01.2009).

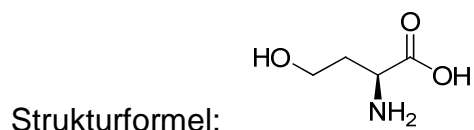
Des Weiteren ist Cycloserin ein kompetitiver Antagonist des D-Alanins, einem Baustein in Bakterienzellwänden. Es führt zur Ansammlung eines unvollständigen Zellwandbausteins (Nukleomukopeptid), der als Folge durch Hemmung der Enzyme Alanin-Racemase und Alanin-Synthetase nicht weiterverarbeitet werden kann. Es kommt zu Zellwandschäden. Auch verschiedene Transaminasen sind Ziel von Cycloserin (www.baacklab.de).

Es ist auch bekannt, dass D-Cycloserin selektiv an der Glycin-Bindungsstelle (Strychnin-unempfindliche Glycin-Bindungsstelle) des NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptors wirkt (Watson et al., 1990).

Erst teilweise erforscht ist der Einsatz von Cycloserin in der Verhaltenstherapie. Man fand heraus, dass die Psychotherapie bestimmter Angststörungen unter einer begleitenden Behandlung mit Cycloserin deutlich effektiver verläuft. Dabei wirkt Cycloserin nicht angstdämpfend, sondern verstärkt die Wirkung des in Form einer Angstexposition angewendeten psychotherapeutischen Verfahrens. Der Patient wird wiederholt mit der angstausslösenden Situation konfrontiert und lernt nach und nach, dass seine Angst in Wirklichkeit unbegründet ist. Wenige, niedrig dosierte Gaben von Cycloserin führten dazu, dass dieser Lernvorgang rascher abgeschlossen werden konnte (Hofmann et al., 2006).

Homoserin

IUPAC-Name: (2S)-2-Amino-4-hydroxybutansäure



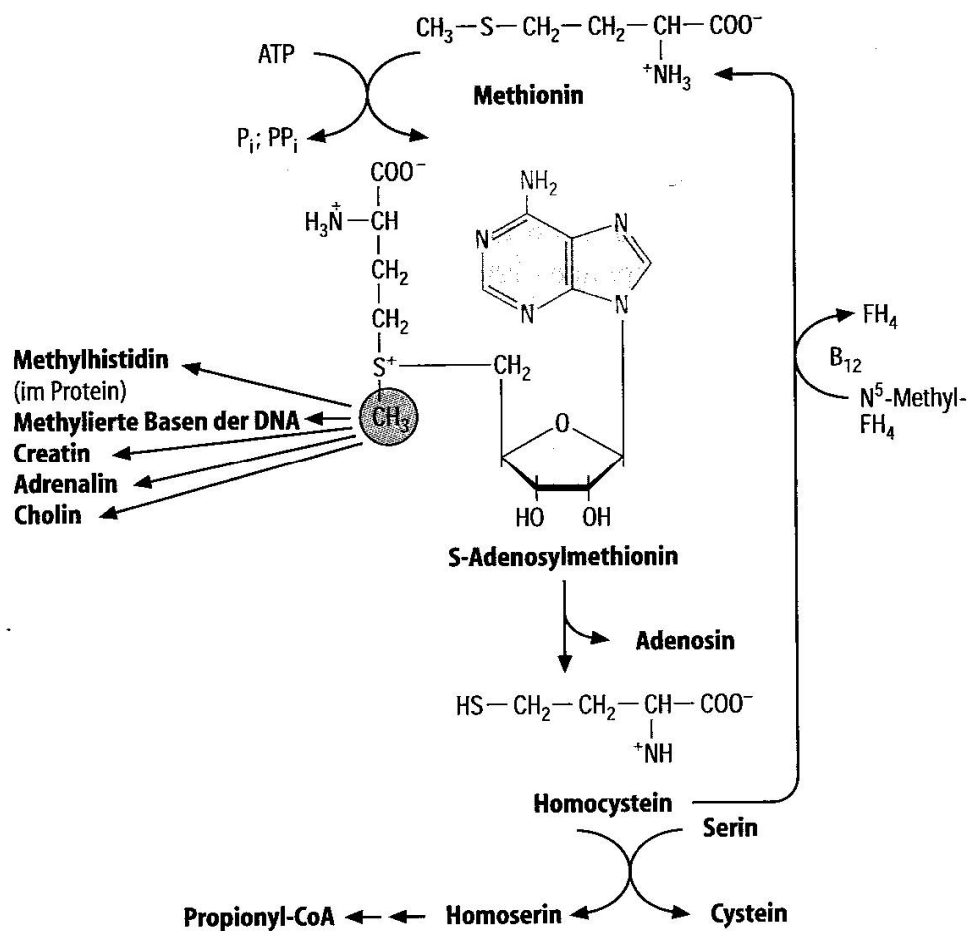
CAS-Nr.: 672-15-1

Summenformel: $C_4H_9NO_3$

Molekulargewicht: 119.12 g/mol

Homoserin ist eine nichtproteinogene, polare α -Aminosäure (Hydroxy-aminosäure). Es ist ein Zwischenprodukt im Stoffwechsel von Methionin. Es

entsteht bei der chemischen Spaltung von methioninhaltigen Peptiden als neue carboxylendständige Aminosäure.

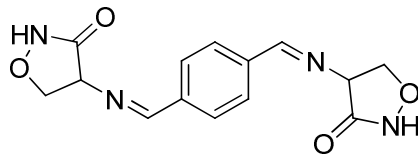


Quelle: Löffler, Basiswissen Biochemie, 6. Aufl., Springer Medizin Verlag Heidelberg

Abbildung 7: Methionin Stoffwechsel.

Terizidon

IUPAC-Name: 4,4'-{1,4-phenylen-bis[(E)-methylyliden-nitrilo]}-bis isoxazolidin-3-on



Strukturformel:

CAS-Nr.: 25683-71-0

Summenformel: $C_{14}H_{14}N_4O_4$

Molekulargewicht: 302.29 g/mol

Terizidon ist ein Kondensationsprodukt von Cycloserin und wird als Tuberkulosemedikament eingesetzt (erstmals 1968). Es wird als Reserve-medikament in Fällen bakterieller Resistenz verabreicht oder vor allem bei hepatischen Unverträglichkeiten gegen andere Tuberkulosemedikamente. Chemisch gesehen handelt es sich bei Terizidon um eine sog. Schiff'sche Base, auch Imin genannt, d. h. es ist ein Kondensationsprodukt aus einem Aldehyd und einem Amin. In diesem Fall Cycloserin mit Terephthaldialdehyd (Benzolring mit zwei gegenüberliegenden para-ständigen Aldehydgruppen). Da Imine unter bestimmten Bedingungen ohne weiteres wieder zu spalten sind, entsteht hierbei Cycloserin.

In der Behandlung von Erwachsenen (ab 14 Jahren) werden im Allgemeinen 750 – 1000 mg/Tag in drei bis vier Einzeldosen verabreicht (3 – 4 Kapseln pro Tag, 1 Kapsel enthält 250 mg Wirkstoff). Die Kapseln sollten mit etwas Flüssigkeit unzerkaut zu den Mahlzeiten eingenommen werden. Die Behandlungsdauer kann je nach Behandlungsschema sechs bis zwölf Monate betragen.

Als häufige Nebenwirkungen des Terizidons werden zentralnervöse Störungen in Form von Kopfschmerzen, Schwindelgefühl, Erregbarkeit, Zittern, Schlaflosigkeit und Trunkenheit angegeben. Selten bis gelegentlich treten epileptoide Krampfanfälle und Psychosen, sowie gastrointestinale Beschwerden auf. Ebenfalls selten kann es zu allergischen Reaktionen mit Hautausschlag kommen.

Als Wechselwirkung mit anderen Medikamenten ist bei gleichzeitiger Gabe von Isoniazid mit einer erhöhten Krampfbereitschaft zu rechnen. Alkohol, Isoniazid sowie Protionamid können die möglichen Nebenwirkungen des Terizidons auf das Zentralnervensystem verstärken.

Spektralphotometrie

Die mit Abstand am häufigsten angewandte Analysenmethode der klinisch-chemischen Laboratoriumsdiagnostik ist die Spektralphotometrie.

Sichtbares Licht ist der Bereich elektromagnetischer Strahlung, der mit dem Auge direkt wahrgenommen werden kann. Als Licht werden häufig auch noch solche Bereiche des elektromagnetischen Spektrums bezeichnet, die für Menschen nicht sichtbar sind, wie das Ultraviolett- bzw. das Infrarot-Licht (UV- bzw. IR-Strahlung).

Zerlegt man weißes Licht beispielsweise mit einem Prisma, ergibt sich ein farbiges Spektrum mit folgenden Zuordnungen (Tab.1):

Tabelle 1: Farb-Spektrum in der Spektralphotometrie

Farbe	Wellenlänge nm	
UV-Strahlung	<380	
Violett	380-450	Sichtbarer Bereich des Lichts
Blau	450-500	
Grün	500-570	
Gelb	570-590	
Orange	590-620	
Rot	620-780	
IR-Strahlung	>780	

Je nach Anforderungen werden in der Spektralphotometrie sichtbares Licht, UV- oder IR-Strahlen eingesetzt. Bei den hier dargestellten Untersuchungen wurde sichtbares Licht verwendet.

Die Farbintensität der Lösung wird bei der spektralphotometrischen Methode indirekt aus der Absorption bzw. der Lichtdurchlässigkeit der Lösung bestimmt. So können anorganische wie auch organische Stoffe, die in Spuren in den verschiedensten Materialien vorkommen, bestimmt werden. Diese Methode beruht auf gezielte Farbreaktionen der Lösung, die durch Lichtschwächung gemessen werden kann.

Durchdringt ein Lichtstrahl eine mit Flüssigkeit gefüllte Küvette, so wird er abgeschwächt. Der austretende Lichtstrom ist demnach kleiner als der eintretende.

Der Verlust des Lichtstroms ist durch vier Ursachen bedingt:

1. Reflexion des Lichtes an den Grenzflächen Luft/Glas bzw. Glas/Flüssigkeit.
2. Lichtabsorption im Küvettenmaterial.
3. Streuung an dispergierten Teilchen in der Flüssigkeit.
4. Absorption des Lichtes in der Probenlösung.

Die Punkte 1 und 2 brauchen nicht berücksichtigt werden, da diese bei Nullabgleich eliminiert werden. Punkt 3 sollte nicht auftreten, eine Messung darf nur in einer homogenen Lösung vorgenommen werden. Punkt 4 ergibt den gesuchten Messwert.

Es gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz. Das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreibt den Zusammenhang zwischen der Absorption von Licht und der Konzentration eines absorbierenden Inhaltsstoffs in Flüssigkeiten. Es belegt, dass sich die Verringerung der Lichtmenge aus drei physikalischen Phänomenen ergibt:

1. Die Menge der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit (Konzentration).
2. Der Weg, den das Licht durch die Flüssigkeit zurücklegen muss (Schichtdicke).
3. Die Wahrscheinlichkeit, dass das Photon jener speziellen Wellenlänge durch die Substanz absorbiert wird (Absorptions- oder Extinktionskoeffizient).

Diese Beziehung kann so dargestellt werden:

$$A = \epsilon \cdot X \cdot C$$

A	Absorption
ϵ	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
C	Konzentration der absorbierenden Substanz
X	Schichtdicke

Extinktion

In der Optik ist die Extinktion die wahrnehmungsgerecht logarithmisch formulierte Opazität O , und damit ein Maß für die Abschwächung (Schwärzung) einer Strahlung (zum Beispiel Licht) in einem Medium.

Mit I_0 als einfallender Strahlung und als austretender Strahlung (nach dem Durchqueren des Mediums) beschreibt die Extinktion E als logarithmische Größe die Transmission T bei einer bestimmten Wellenlänge λ :

$$E_{\lambda} = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{1}{\tau_{\lambda}} = \lg O_{\lambda}$$

Der Anteil der durchgelassenen Strahlung wird als Transmissionsgrad bezeichnet. Die Abschwächung setzt sich im Allgemeinen zusammen aus Absorption, Streuung, Beugung und Reflexion. Sie ist wellenlängenabhängig. Die Extinktion ist der negative dekadische Logarithmus des Transmissionsgrades. Durch Aufnehmen der Extinktion bei einzelnen Lichtwellenlängen kann die Konzentration und die Reinheit von Stoffen in Lösung untersucht werden.

2 HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNG

Die Pilzerkrankung Pityriasis versicolor kann durch die bisherigen Behandlungsmethoden mit Antimykotika zwar vorübergehend symptomatisch behandelt, aber nicht geheilt werden. Es bleiben immer einige Hefepilze auf der Haut zurück, die für einen erneuten Krankheitsausbruch verantwortlich sein können.

Ein weiteres Problem sind die depigmentierten Hautareale. Sind bereits depigmentierte Hautareale entstanden, so sind diese für eine Behandlung mit Antipilzmitteln nicht mehr zugänglich.

Die klinischen Phänomene der Pityriasis versicolor wie Hyperpigmentierung, Depigmentierung und Fluoreszenz der Läsionen können zumindest zum Teil durch die Bildung Tryptophan-abhängiger Indolpigmente erklärt werden. Die Pigmentbildung ist abhängig von einem einzigen enzymatischen Schritt, der Desaminierung von Tryptophan zu Indolpyruvat durch die Malassezia-eigene Transaminase 1 (TAM 1).

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Gibt es einen oder mehrere Transaminaseinhibitoren, die spezifisch die Tryptophan-Aminotransferase 1 (TAM 1) hemmen?
- Und können ggf. diese Inhibitoren wirkungsvoll zur Behandlung und Prophylaxe der Kleinflechte eingesetzt werden?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Anzucht und Kultur von *Malassezia furfur*

Die Dauerkultur der Referenzstämme von *Malassezia furfur* CBS 1878 und *Malassezia furfur* CBS 7019 erfolgten auf Dixon-Agar (Gueho et al., 1996).

Einmal wöchentlich wurden die Hefen auf frisch zubereitetem Agar ausgestrichen.

3.2 Verwendete Nährmedien

3.2.1 Dixon-Agar

Der Dixon-Agar als Nährboden für die Kultivierung von *Malassezia furfur* wurde selbst hergestellt. Dazu wurden die in Tabelle 2 angegebenen Mengen von Agar, Malzextrakt, Pepton und Ochsen-galle mit chemisch reinem Wasser in einen Erlenmeyerkolben gegeben und mit einem Magnetrührer (IKAMAG, IKA-Labortechnik, Staufen im Breisgau) vermischt, mit Alu-Folie abgedeckt und bei 1 bar über 30 min autoklaviert (Melag Autoklaven Typ 23, Melag, Berlin). Aus Kostengründen wurde dem hier verwendeten Dixon-Agar 0,4 % Olivenöl statt Glycerol und Ölsäure zugesetzt. Zur Verringerung des Kontaminationsrisikos wurden Chloramphenicol und Cycloheximid hinzugefügt. Die einzelnen Lösungen wurden steril filtriert und dem Medium nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C zugesetzt, da die beiden Substanzen temperaturempfindlich sind (Merck Index 2001) und ebenfalls mit dem Magnetrührer vermengt.

Unmittelbar danach wurden unter einer Sterilbank (Uniflow Biohazard Laminar Flow, Gerätetyp UVUB 1200, Uniequip Laborgerätebau, Martinsried) unter Zuhilfenahme einer sterilen 20 ml Einmalspritze (B. Braun, Melsungen) jeweils

15 ml des Nährbodens in Kunststoff-Petrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) gegeben.

Tabelle 2: Mengen und Substanzen zur Herstellung von Dixon-Agar

Mengen*	Substanzen	Hersteller
9 g	3,6% Malzextrakt	Merck, Deutschland
1,5 g	0,6% Pepton (Casein)	Merck, Deutschland
5 g	2% Ochsen-galle	Merck, Deutschland
2,5 ml	1% Tween 40	Sigma-Aldrich, Deutschland
1 ml	0,4% Olivenöl	sterilisiert aus der Apotheke
5 g	1,2% Agar	Merck, Deutschland
250 ml	chem. reines Wasser (Aq. dest.)	Braun, Deutschland
0,01 g	0,04% Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Deutschland
0,0125 g**	0,005% Chloramphenicol	Merck, Deutschland

* Für 250 ml Medium.

** Die Stammlösung besteht aus: 6,25 mg Chloramphenicol / 1 ml H₂O und wurde steril filtriert abgefüllt und bei -20 °C gelagert; 2 ml der Stammlösung wurden zugegeben.

3.2.2 Pigmentinduktionsmedium (P-Agar)

Zur Herstellung eines Liters des Pigmentinduktionsmediums wurde der Agar mit chemisch reinem Wasser in einen Erlenmeyerkolben gegeben, mit einem Magnetrührer (IKAMAG, IKA-Labortechnik, Staufen im Breisgau) vermischt und anschließend mit Alu-Folie abgedeckt. Nach dem Autoklavieren bei 1 bar für 30 Minuten (Melag Autoklaven Typ 23, Melag, Berlin) und Abkühlen auf etwa 50 °C wurden das Tween 80 und das L-Tryptophan hinzugegeben und nochmals mit dem Magnetrührer vermischt. Unmittelbar danach wurden unter einer Sterilbank (Uniflow Biohazard Laminar Flow, Gerätetyp UVUB 1200, Uniequip Laborgerätebau, Martinsried) unter Zuhilfenahme einer sterilen 20 ml Einmalspritze (B. Braun, Melsungen) jeweils 25 ml des Nährbodens in Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) gefüllt. Der pH-Wert des Mediums lag bei 5,0.

Tabelle 3: Mengen und Substanzen zur Herstellung von Pigmentinduktionsmedium

Mengen*	Substanzen	Hersteller
20 g	Agar	Merck, Deutschland
990 ml	chem. reines Wasser (Aq. dest.)	Braun, Deutschland
30 ml	Tween 80	Merck, Deutschland
10 g	L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Deutschland

* Für ein Liter Medium.

3.2.3 Modifiziertes Pigmentinduktionsmedium

Für 300 ml dieses Mediums wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Mengen der Substanzen (Agar, Glucose, KH_2PO_4 und MgSO_4) mit chemisch reinem Wasser in einen Erlenmeyerkolben gegeben und mit einem Magnetrührer (IKAMAG, IKA-Labortechnik, Staufen im Breisgau) vermischt. Anschließend wurde das Gemisch mit Alu-Folie abgedeckt und bei 1 bar für 30 Minuten autoklaviert (Melag Autoklaven Typ 23, Melag, Berlin). Nachdem das Medium auf etwa 50 °C abgekühlt war, wurden das Tween 80 und das L-Tryptophan hinzugegeben und ebenfalls mit dem Magnetrührer vermischt. Im Anschluss wurden unter einer Sterilbank (Uniflow Biohazard Laminar Flow, Gerätetyp UVUB 1200, Uniequip Laborgerätebau, Martinsried) unter Zuhilfenahme einer sterilen 20 ml Einmalspritze (B. Braun, Melsungen) jeweils 25 ml in Kunststoff-Petrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) appliziert.

Tabelle 4: Mengen und Substanzen zur Herstellung von modifiziertem Pigmentinduktionsmedium

Menen*	Substanzen	Hersteller
6 g	Agar	Merck, Deutschland
3 g	Glucose	Merck, Deutschland
0,3 g	KH ₂ PO ₄	Merck, Deutschland
0,15 g	MgSO ₄	Merck, Deutschland
300 ml	chem. reines Wasser (Aq. dest.)	Braun, Deutschland
9 ml	Tween 80	Merck, Deutschland
0,9 g	L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Deutschland

* Für 300 ml Medium.

3.2.4 Minimal-Flüssignährmedium

Das Minimal-Flüssignährmedium wurde von Gohla et al. speziell für die Pigmentinduktion von *Malassezia furfur* entwickelt (Gohla et al., 2008).

Zunächst wurde chemisch reines Wasser mit den entsprechenden Salzen (siehe Tabelle 5) in einen Erlenmeyerkolben gegeben, mit Alufolie abgedeckt und im Autoklaven bei 1 bar für 30 min. sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurden Tween 80, Chloramphenicol und die gewünschte Konzentration der Aminosäure hinzugefügt. Der pH-Wert des Minimalnährmediums betrug vor Zugabe der Aminosäuren und der Hefen 5,0.

Die Ansätze mit den zugefügten Hefen wurden mit Aluminiumfolie dicht verschlossen und im Wärmeschrank bei ca. 32 °C inkubiert.

Tabelle 5: Mengen und Substanzen des Minimal-Flüssignährmediums

Mengen	Substanzen	Hersteller
100 ml	chem. reines Wasser (Aq dest.)	Braun, Deutschland
0,7 ml	Chloramphenicol	Merck, Deutschland
0,1 g	KH_2PO_4	Merck, Deutschland
0,05 g	MgSO_4	Merck, Deutschland
3,0 ml	Tween 80	Merck, Deutschland
versch. Konzentrationen	L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Deutschland

Flüssigmediumversuch

Die Hefezellen wurden mit Hilfe eines sterilen Watteträgers von den Agarplatten abgeerntet und im Mörser mit einem Pistill unter sterilen Bedingungen zerkleinert. Anschließend wurden die Pilze in sterile Kunststoffröhrchen gegeben und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung einmal gewaschen. Dies erfolgte in einer Zentrifuge (Firma Hettich, Rotanta/RP; Rotor: 154 mm Radius) bei 20 °C, 3000 U/min und 3 Minuten. Der Überstand wurde mit einer sterilen Pipette abgesaugt.

Schließlich wurden die Hefen mit 5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert um eine Bestimmung der Zellzahl zu ermöglichen. Auf dem Reagenzglasrüttler (Firma Vortex, Genie 2TM) wurden die Pilzzellen gründlich mit NaCl vermischt.

Es folgte das Verdünnen der Suspension mit NaCl. Hierzu wurden 10 µl der Lösung mit 90 µl NaCl-Lösung in ein steriles Kunststoffröhrchen pipettiert. Hieraus wurden 10 µl entnommen und mit weiteren 90 µl NaCl verdünnt um eine 100-fach verdünnte Lösung zu erhalten.

Zum Auszählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer wurden 10 µl der verdünnten Zellsuspension entnommen und im Lichtmikroskop (Lichtmikroskop Dialux; Firma Ernst Leitz, Wetzlar; Service: Leica; 40er Objektiv) unter 40-facher Vergrößerung betrachtet. Ausgezählt wurden fünf Quadrate und hierbei alle innerhalb der Gruppenquadrate liegenden Zellen sowie die auf den jeweiligen linken und unteren Begrenzungslinien liegenden Zellen (Pschyrembel).

Die Gesamtzahl der Zellen in der Suspension wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Zellzahl} = S \times 50 \times V / \mu\text{l}$$

S = Summe der ausgezählten Zellen, V = Verdünnungsfaktor, in diesem Fall 100.

$[N/\mu\text{l} = S/(V_k \times N_k) = S/(0,25 \times 10^{-3}\mu\text{l} \times 80) = S/(20 \times 10^{-3}) = S \times 50/\mu\text{l}; N/\mu\text{l} = \text{Anzahl der Zellen pro Mikroliter Suspension},$

S = Summe der ausgezählten Zellen in fünf Gruppenquadranten,

$V_k = \text{Volumen über einem Kleinstquadrat } (0,25 \times 10^{-3}),$

$N_k = \text{Anzahl der ausgezählten Kleinstquadrate } (16 \times 5 = 80),$

zusätzliche Beachtung des Verdünnungsfaktors erforderlich.]

Vereinfacht:

Gezählte Zellen $\times 50 \times 100 \times (\text{Volumen der Lösung} - 10 \mu\text{l}) = \text{Anzahl der Zellen in der Suspension}.$

Das Einstellen der Lösung auf die gewünschte Konzentration erfolgte durch Entnahme einer entsprechenden Menge Suspension, die wiederum in der Zentrifuge (20 °C; 3000 U/min; 3 min) gewaschen wurde.

Das verbleibende Hefe-Pellet wurde anschließend mit dem Flüssignährmedium versetzt. Die Flüssignährmedium-Hefen-Suspension wurde in einen Wärmeschrank bei 32 °C gestellt. Ein Kontrollansatz wurde mit den Versuchsansätzen mitgeführt. Hierbei wurde das Nährmedium mit Pilzen, aber ohne Hemmstoff versehen. Die Probenentnahme erfolgte wie bei den Ansätzen mit den Hemmstoffen (siehe 3.3).

Die Konzentrationen für die Versuche:

- TRP: 30mM
- Hemmstoff: 0,2 M
- Anzahl Zellen:
 1. Cycloserinversuch: 500.000 Zellen/μl Flüssigmedium
 2. Cycloserinversuch und Aminooxyacetatversuch:
300.000 Zellen/μl Flüssigmedium

3.3 Probenentnahme

Die Probenentnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zwei ml der Suspension wurden entnommen und in sterile Kunststoffröhrchen gegeben. Die Proben wurden drei Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert, um ein Pilzpellet und einen Überstand zu erhalten.

Der Überstand wurde abpipettiert und anschließend nochmals filtriert, um letzte Verunreinigungen wie z. B. Zellreste zu entfernen. Dazu wurde ein Vakuumfiltersystem (Firma Macherey-Nagel) mit PTFE-Filtern (Firma J.T. Baker; PTFE-Frits; Porengröße 20 μm) benutzt.

3.4 Photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung des Pigments

Die Messung erfolgte an einem Beckman DU-640 Spektrophotometer. Zur Messung wurden ½ Mikro-Küvetten (Firma ratiolab GmbH, Dreieich; Art.-Nr. 2712120) verwendet. Als erstes wurde der Ansatz ohne die Hefen gemessen und als Referenzwert verwendet. Gegen diese Referenzlösung wurden alle folgenden Proben spektralphotometrisch bestimmt. Der Bereich

der Messung lag im sichtbaren Bereich (600 nm), als Messgeschwindigkeit wurde 600 nm/min gewählt. Es wurde mit dem Scan-Modus „Single-Wavelengthscan“ gemessen.

3.5 Agardiffusionstest

Fünf Ösenabstriche des zuvor auf Dixon-Agar angezüchteten Referenzstammes von *Malassezia furfur* CBS 1878 wurden in 1 ml chemisch reinem Wasser (Aq. dest.) suspendiert, auf den P-Agar aufgegeben und durch schwenken verteilt. Anschließend wurden mit einer sterilen Stanze (Biopsy Punch, Stiefel) 4 mm große Löcher angebracht, in die jeweils 20 µl der Hemmstofflösung in verschiedenen Konzentrationen eingebracht wurden.

3.6 Screening - Die Suche nach einem Hemmstoff

Der erste Schritt bei Beginn der Arbeit war, einen Transaminaseinhibitor für die TAM 1 zu finden. Mit Hilfe einer medline und google-Recherche wurden nachfolgende Substanzen (siehe Tabelle 6) ausgewählt und mit dem Agardiffusionstest sowohl auf Pigmentinduktions-Agar (Hemmung der Pigmentbildung) als auch auf Dixon-Agar (antimyzetische Eigenschaften) getestet. Die Substanzen wurden gemäß Herstellerangaben gelöst und in den Konzentrationen 0,05; 0,1; 0,25 und 0,5 M beim Agardiffusionstest eingesetzt.

Tabelle 6: Getestete Substanzen

Substanz	Hersteller
2-Hydroxyethyl-Harnstoff	Sigma-Aldrich
3-Amino-2,3-dihydrobenzoic acid hydrochloride (Gabaculine)	Sigma-Aldrich
6-Mercaptopurin-Monohydrat	Sigma-Aldrich
6-Thioguanin	Sigma-Aldrich
Aminooxyacetat	Sigma-Aldrich
Cycloserin	Sigma-Aldrich
D-Galaktosamin-Hydrochlorid	AppliChem GmbH
Doxepinhydrochlorid (Doneurin 25 mg)	Hexal
Homoserin	Sigma-Aldrich
Ketoconazole	Sigma-Aldrich
L-Citrulline	Sigma-Aldrich
L-Ornithin	Sigma-Aldrich
L-Threonine	Sigma-Aldrich
Moclobemid (Aurorix 150 mg)	Roche Pharma AG
N-(α)-Benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide hydrochloride	Sigma-Aldrich
Propylenglycol	Fluka, Sigma-Aldrich
Pyrimidine	Sigma-Aldrich
Selenium sulfide	Alfa Aesar
Terizidon	Riemser Arzneimittel AG
Thesit Substanz (Polidocanol)	Gepepharm GmbH
Trans-4-Hydroxy-L-Proline	Sigma-Aldrich
Tranylcypromin (Jatrosom 20 mg)	esparma GmbH
Tunicamycin	Fluka, Sigma-Aldrich
Vigabatrin (Sabril 500 mg)	Sanofi Aventis

3.7 Vorversuche mit 12-Well-Platten

Um abschätzen zu können, ab welcher Konzentration der Hemmstoff wirkt, wurde ein Vorversuch in einer 12 Well-Platte durchgeführt:

Für diesen Versuch wurden handelsübliche Terizidon Tabletten verwendet.

1. Es wurde eine 1 molare Lösung von Terizidon mit Flüssigmedium hergestellt. Diese wurde linear bis zu einer Konzentration von 1: 2048 verdünnt.
2. Die Verdünnungen wurden – im gleichen Volumen (1,5 ml) – wie die vorher in die Vertiefungen der 12 Well-Platte gegebene Pilzlösungen – hinein pipettiert.
3. Die Platten wurden in den Wärmeschrank gestellt und bei 32 °C inkubiert.

3.8 Plattenverdünnungstest

Es wurde eine lineare Verdünnungsreihe mit dem jeweiligen Hemmstoff hergestellt. Die Ausgangskonzentration lag bei 1 M (Cycloserin, Aminooxyacetat und Homoserin) bzw. bei 0,5 M (Terizidon). Es wurden 10 Verdünnungen mit chemisch reinem Wasser (Aq. dest.) vorgenommen. Ein Kontrollansatz ohne Hemmstoff erfolgte parallel.

Je 2 ml dieser Verdünnungen wurden in Petrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK) pipettiert. Anschließend wurde unter Zuhilfenahme einer sterilen Einmalspritze 20 ml frisch gekochter Pigmentinduktions-Agar in diese Petrischalen gegeben und der Agar wurde durch Schwenken mit dem

Hemmstoff vermischt. Nach Erkalten wurde der Pilz *Malassezia furfur* CBS 1878 auf dem Agar ausgestrichen und bei 30 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach drei, fünf und acht Tagen wurde das Ergebnis abgelesen.

3.9 Fütterversuch mit Tryptophan

Nach erfolgreichem Agardiffusionstest wurde bei einer Hemmung der Pigmentbildung versucht, diese durch hinzufügen von einer 1-molaren Tryptophanlösung rückgängig zu machen. Dieser Versuch könnte Hinweise auf die Reversibilität der Hemmwirkung geben. An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurden täglich 20 µl der TRP-Lösung in die Stanzlöcher pipettiert und anschließend das Ergebnis ausgewertet.

3.10 Ausstreichen des Pilzes aus dem Hemmhof

Für die Substanzen mit positivem Ergebnis (Hemmung der TAM 1) wurde ein Folgeversuch durchgeführt: Der Pilz wurde vorsichtig mit einem sterilen Watteträger aus dem Hemmhof von den Pigmentinduktions-Agarplatten abgeerntet und auf Dixon-Agar ausgestrichen. Nach erneuter Inkubation bei 30 °C für drei Tage wurde dann das Ergebnis abgelesen.

3.11 Heilversuch mit Cycloserin

Als Therapieversuch bzw. probatorische Heilbehandlung gilt die Anwendung von zugelassenen Arzneimitteln außerhalb der zugelassenen Indikationen und Dosierungen (Off-label Use). Cycloserin ist für andere, als in dieser Studie beschriebene Indikationen als Arzneimittel zugelassen. Es konnte daher in Absprache mit der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen ein solcher Heilversuch durchgeführt werden.

Die Probanden stellten sich in der Ambulanz der Dermatologie der Justus-Liebig-Universität Gießen vor. Alle litten an einer rezidivierenden PV und waren mit den bisherigen Therapiemaßnahmen unzufrieden. Sie wurden ausführlich über die Möglichkeiten einer neuen Therapieoption, der topischen Anwendung von Transaminasehemmern, aufgeklärt (vgl. 9.2. S. 115). Das Aufklärungsgespräch und das Einverständnis der Probanden zur Durchführung eines Heilversuches wurden schriftlich dokumentiert. Alle verwendeten Unterlagen wurden mit der zuständigen Ethikkommission abgestimmt.

Bei der Eingangsuntersuchung wurde die Patientenanamnese erhoben, eine klinische Beurteilung der Haut vorgenommen, Schuppen von einer betroffenen Stelle für ein Nativpräparat gewonnen und die erkrankten Hautareale fotografiert. Es wurde ein Therapie-Areal festgelegt, welches der Patient mit der nachfolgenden Lösung behandeln sollte (vgl. 9.3. S. 116).

Den Patienten wurden 50 ml einer Cycloserin-haltigen Lösung (0,2 M, pH 7) zum Auftragen auf die gekennzeichnete Hautregion ausgehändigt, welche fünf Tage lang zweimal täglich, jeweils morgens und abends nach dem Duschen oder Waschen angewendet werden sollte. Pro Tag sollten hierfür nicht mehr

als 10 ml der kühl zu lagernden Lösung verwendet werden. Den Probanden wurde ein „Tagebuch“ ausgehändigt, in welche sie die Veränderungen der Haut dokumentieren sollten (vgl. 9.4. S. 120).

Nach sieben Tagen wurden die Patienten erneut untersucht und das Behandlungsergebnis mittels Fotodokumentation festgehalten. Ein zweiter Kontrolltermin erfolgte nach 14 Tagen. Es wurde ebenfalls eine Fotodokumentation durchgeführt.

Nach der Behandlungszeit wurde zur Kontrolle der bestehenden Hemmwirkung mit der vom Patienten verwendeten Lösung ein Agardiffusionstest durchgeführt.

Die von der Apotheke des Universitätsklinikums Gießen-Marburg hergestellte wässrige D-Cycloserin-Lösung (0,2 M, pH 7) setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 7: Mengen und Substanzen der Cycloserin-Lösung

Mengen*	Substanzen	Hersteller
204,2 mg	D-Cycloserin	Sigma-Aldrich, Deutschland
5 mg	KH ₂ PO ₄	Merck, Deutschland
167 mg	K ₂ HPO ₄	Merck, Deutschland

*Für 10 ml wässrige steril filtrierte Lösung.

Die Lösung enthielt keine Konservierungsmittel, um eine Eigenwirkung der Grundlage auszuschließen und wurde jeweils in der krankenhauseigenen Apotheke frisch hergestellt (Haltbarkeit 7 Tage).

Die Eingangsdaten der Probanden sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 8: Probanden - anamnestische Daten

Patient	Alter	Geschlecht	Wie lange PV	Prädispositionsfaktoren	Familienanamnese
L.D.	19	männlich	seit 8 Jahren	schwitzen, Okklusiv Effekt von synthetischer Sportkleidung	positiv, Vater und Bruder ebenfalls erkrankt
M.-R. B.	19	männlich	seit 7 Jahren	Fast food, Alkohol und schwitzen	positiv, Mutter an PV erkrankt
S.S.	36	männlich	seit 10 Jahren	schwitzen	positiv, Cousin an PV erkrankt
S.H.	45	weiblich	seit 2 Wochen	keine	negativ
M.M.	23	männlich	seit 2 Monaten	keine	negativ
T.K.	45	männlich	seit 3 Jahren	schwitzen	negativ
K.A.	25	männlich	seit 1 Monat	keine	negativ

4 ERGEBNISSE

4.1 Screening – Die Suche nach einem Hemmstoff

Bereits nach eintägiger Inkubation bei 32 °C in einem Brutschrank konnte eine Braunverfärbung des Pigmentinduktions-Agars als Ausdruck der Pigmentbildung optisch nachgewiesen werden. Bei den Substanzen Aminooxyacetat, Cycloserin, Homoserin und Terizidon war eine deutliche Hemmung der Pigmentbildung in den Diffusionshöfen zu erkennen.

Bei allen weiteren getesteten Substanzen (siehe Tabelle 6) setzte eine gleichmäßige Pigmentbildung auf der gesamten Petrischale, auch im Bereich der Diffusionshöfe, ein. Eine Hemmung der TAM 1 und damit der Pigmentbildung konnte bei diesen Substanzen nicht nachgewiesen werden.

Die Kontrolle auf Dixon-Agar zeigte nur bei der Substanz Ketoconazol einen Hemmhof. Dies deutet darauf hin, dass die Pilze durch den Wirkstoff abgetötet wurden. Bei allen anderen Substanzen setzte ein gleichmäßiges Pilzwachstum auf Dixon-Agar ein, eine antimyzetische Wirkung konnte in den eingesetzten Konzentrationen nicht nachgewiesen werden.

4.2 Ausstreichen des Pilzes aus dem Hemmhof

Dieser Test wurde mit den vier Hemmstoffen Aminooxyacetat, Cycloserin, Homoserin und Terizidon durchgeführt. Wie vermutet zeigte der Pilz auf allen angelegten Kulturen auf Dixon Agar ein normales Wachstum. Dieser Test diente dem Nachweis, dass die Hemmstoffe den Pilz nicht abtöten und einen

antimyzetischen Effekt haben. Die TAM 1 wird durch die Substanzen spezifisch gehemmt.

4.3 Fütterversuch mit Tryptophan

Bei den Substanzen Aminoxyacetat, Cycloserin und Terizidon zeigte sich keine Veränderung des Hemmhofes durch das Hinzufügen des Tryptophans. Lediglich bei der Substanz Homoserin ließ sich der Hemmhof rückgängig machen und es zeigte sich nach fünf Tagen eine gleichmäßig braun verfärbte Agarplatte.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es sich bei Homoserin um einen kompetitiven Hemmstoff handelt. Bei den anderen drei Substanzen handelt es sich um eine komplette Hemmung der TAM 1, die auch durch dieses Überangebot von Tryptophan nicht rückgängig gemacht werden kann.

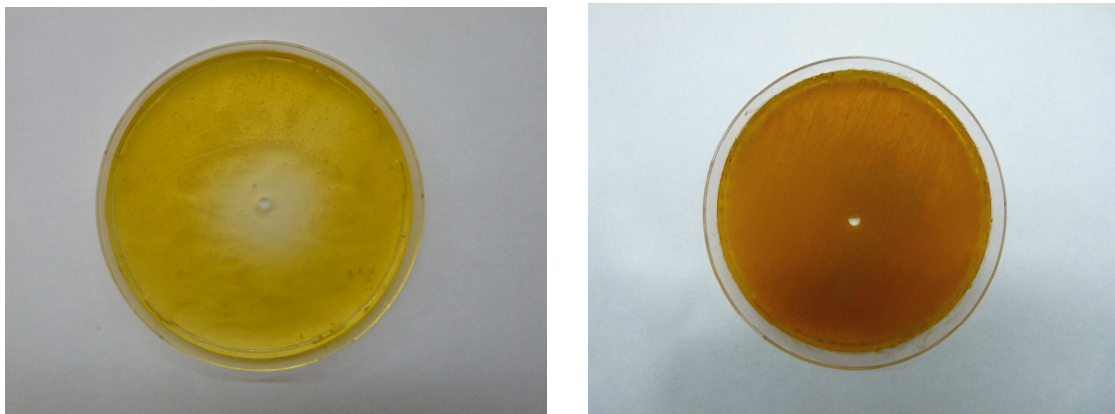


Abbildung 8: Fütterversuch mit Homoserin (1M).

Die Abbildung 8 zeigt links den Agardiffusionstest vor dem Fütterversuch. Rechts kann man deutlich die Pigmentbildung im Hemmhof nach Gabe des Tryptophans über fünf Tage erkennen.

4.4 Ergebnisse Aminooxyacetat

4.4.1 Agardiffusionstest



Abbildung 9: Agardiffusionstest auf P-Agar mit Aminooxyacetat.

Abbildung 9 zeigt eine vier Tage alte Kultur von *Malassezia furfur* CBS 1878 auf pigment-induzierendem Medium mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle. Es wurde ein Agardiffusionstest mit Aminooxyacetat (in chem. reinem Wasser gepuffert mit 2 n NaOH auf pH 5) durchgeführt. Die Konzentrationen sind links oben 0,05; rechts oben 0,1; links unten 0,25 und rechts unten 0,5 M. Eine Pigmentbildung in den Diffusionshöfen bleibt aus. Des Weiteren wird das Wachstum des Pilzes gehemmt, da in der speziellen Situation Stickstoff durch die unterbundene Transaminierung nicht verfügbar werden kann und andere Stickstoffquellen nicht mehr zur Verfügung stehen.

Der folgende Versuch zeigt, dass die Hemmwirkung der Pigmentbildung und damit auch ein ausbleibendes Wachstum des Pilzes nicht auf einem antimykotischen Effekt des Transaminaseinhibitors, sondern auf einer spezifischen Hemmung der Transaminase beruhen.

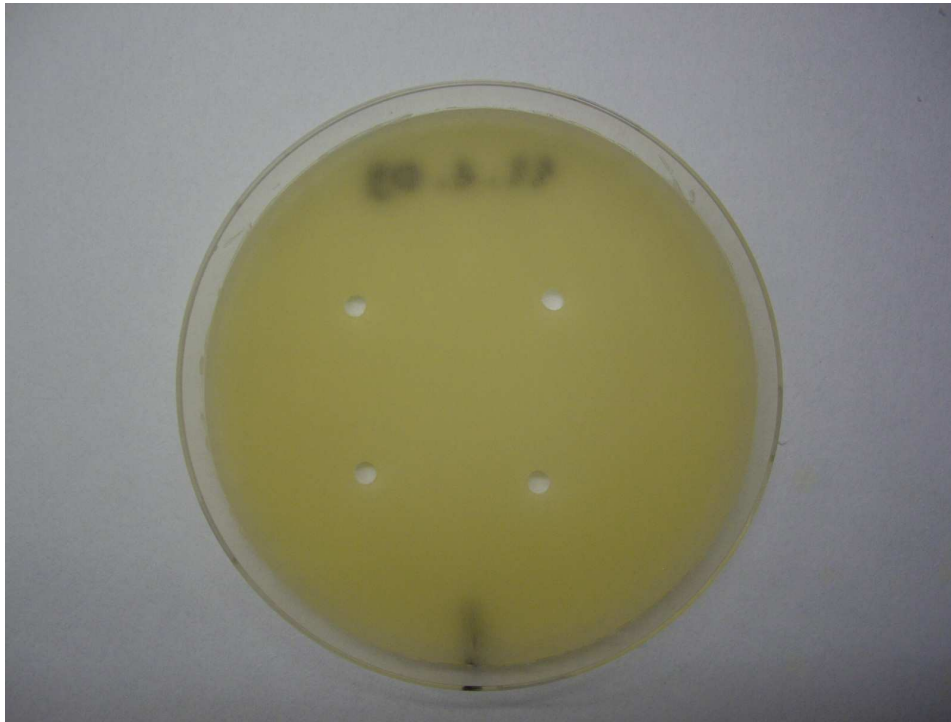


Abbildung 10: Agardiffusionstest auf Dixon-Agar mit Aminoxyacetat.

Die Abbildung 10 zeigt einen identischen Versuchsansatz an dem zur Anzucht des Pilzes üblichen Komplettmedium Dixon-Agar (vier Tage alt). Eine Pigmentbildung wird nicht induziert, da mehrere alternative Stickstoffquellen zur Verfügung stehen. Eine spezifische Hemmung der Transaminierung durch Aminoxyacetat in Konzentration wie unter Abb. 9 führt zu keinen Effekten, da die Hemmung umgangen werden kann. Auch ein toxischer Effekt ist nicht nachweisbar. Das Pilzwachstum ist gleichmäßig, auch im Bereich der Diffusionshöfe. Die in Abbildung 9 beobachtbare Hemmung beruht daher auf einem spezifischen Effekt.

4.4.2 Plattenverdünnungstest

In Abbildung 11 ist der Plattenverdünnungstest mit Aminoxyacetat zu sehen. Sehr deutlich kann man eine vollständige Hemmung der Pigmentbildung in den Platten 1 bis 7 erkennen. D. h. ab einer Konzentration von etwa 15 mM in chem. reinem Wasser hemmt Aminoxyacetat vollständig. Erst ab Platte 8 (siehe Abb. 11) kann eine Pigmentbildung beobachtet werden. Ein Kontrollansatz ohne Hemmstoff wurde mitgeführt. Auf dieser Platte kann man die komplette Pigmentbildung erkennen.

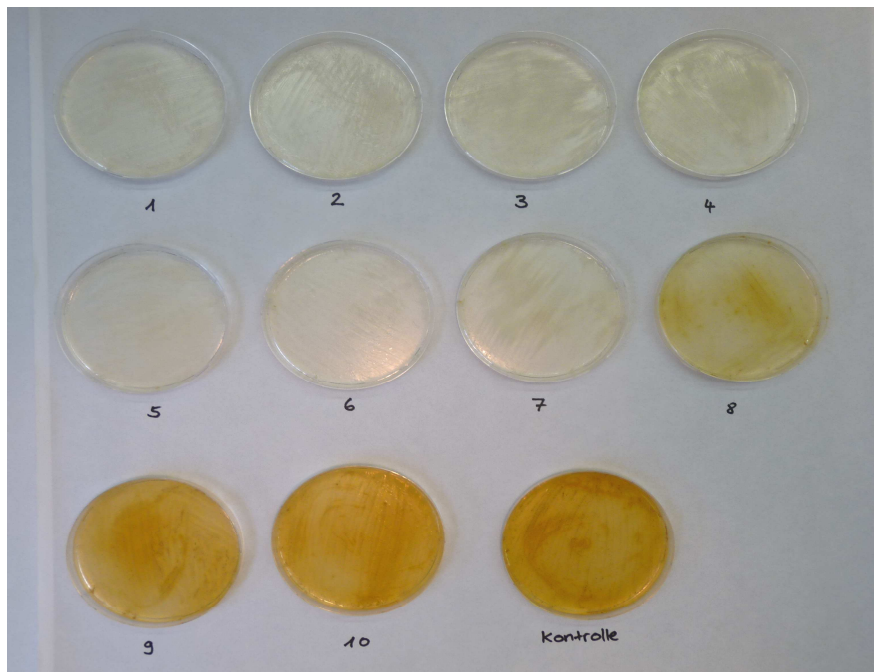


Abbildung 11: Plattenverdünnungstest mit Aminoxyacetat.

Tabelle 9: Konzentrationen Aminoxyacetat

1	1 M	6	~31 mM
2	0,5 M	7	~15 mM
3	0,25 M	8	~8 mM
4	0,125 M	9	~4 mM
5	0,0625 M	10	~2 mM
		11	Kontrolle ohne Hemmstoff

4.4.3 Test im Flüssigmedium

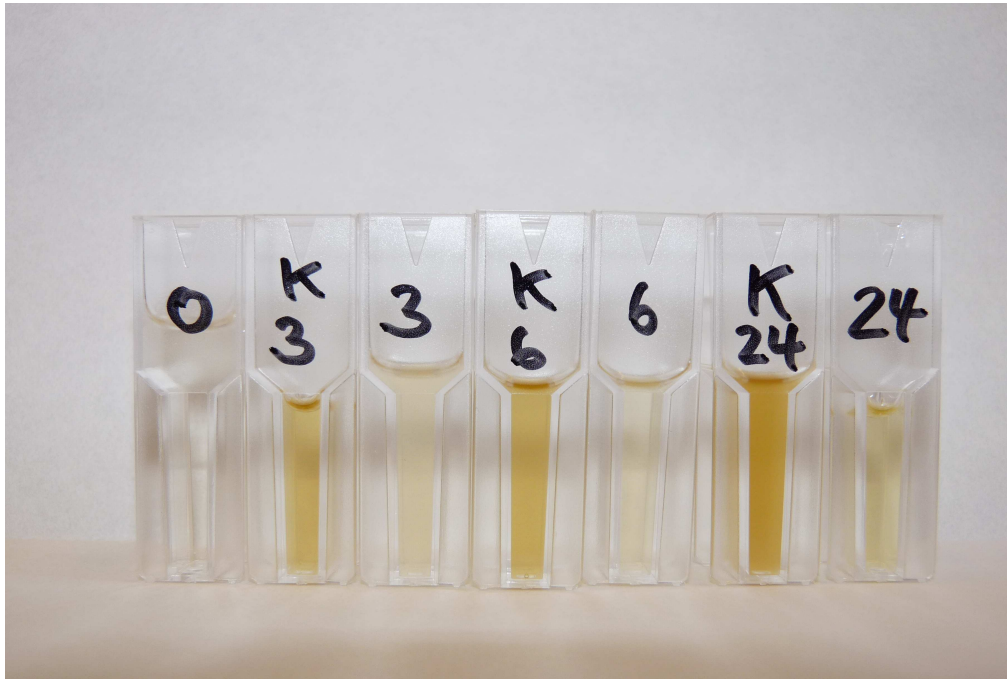


Abbildung 12: Flüssigmediumversuch mit Aminooxyacetat

(Inkubationszeit in Stunden, K=Kontrolle)

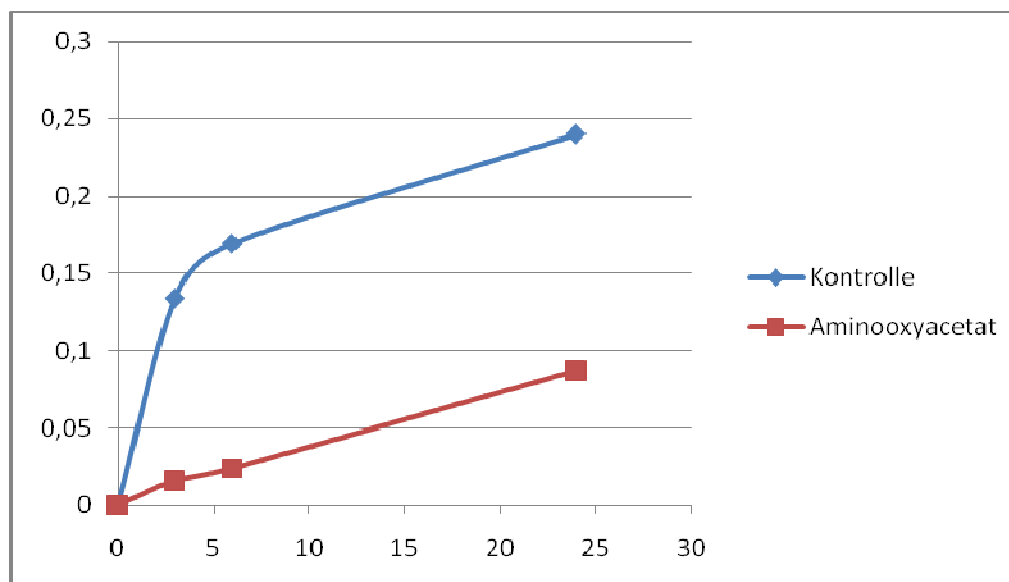


Abbildung 13: Einzelwellenlängenscan bei 600nm. Aminooxyacetat: 0,2 molar

Wie man in Abbildung 12 erkennen kann, verfärben sich die Kontrollansätze (K) deutlich. Schon nach drei Stunden ist eine Pigmentbildung in diesen Ansätzen sichtbar, die sich nach 6 bzw. 24 Stunden noch verstärkt. Mit Null (0) ist der Referenzwert gekennzeichnet, gegen den alle Proben gemessen wurden.

Im Gegensatz zu dem Kontrollansatz, in dem sich nur Flüssigmedium und der Pilz befinden, wurde bei dem Parallelversuch (gleiche Anzahl Pilze im Flüssigmedium) Aminoxyacetat hinzugefügt. Diese Versuch zeigte nur eine sehr geringe Braunfärbung.

Die Proben wurden im Photometer bei einem Einzelwellenlängenscan gemessen (Abbildung 13). Auf der X-Achse ist die Zeit aufgetragen, auf der Y-Achse kann man die Extinktionswerte ablesen. Die Messwerte unterstreichen den visuellen Befund. Die Proben des Kontrollversuchs zeigen eine deutlich höhere Extinktion und damit Braunfärbung als der Aminoxyacetatversuch.

4.5 Ergebnisse Cycloserin

4.5.1 Agardiffusionstest



Abbildung 14: Agardiffusionstest auf P-Agar mit L-Cycloserin.

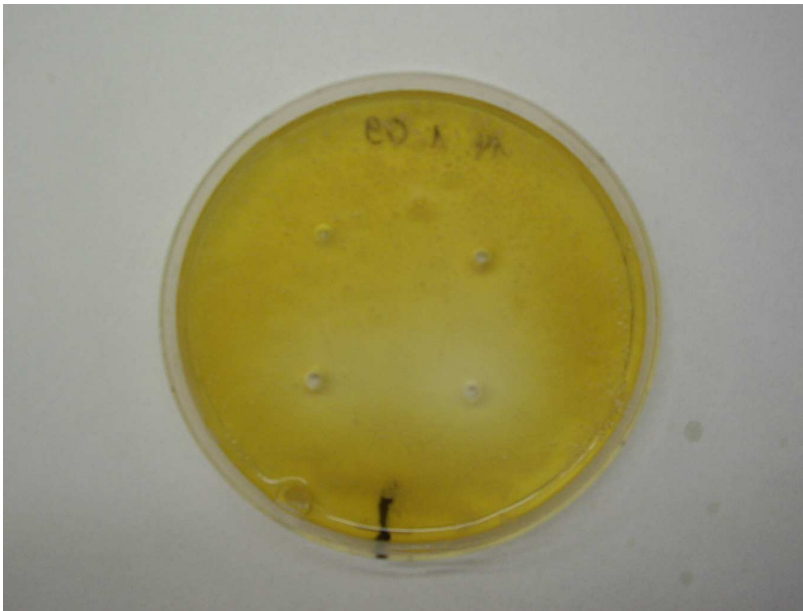


Abbildung 15: Agardiffusionstest auf P-Agar mit D-Cycloserin.

In Abbildung 14 ist die sechs Tage alte Kultur und in Abbildung 15 die vier Tage alte Kultur von *Malassezia furfur* CBS 1878 auf pigment-induzierendem Agar mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle zu sehen. Es wurde ein Agardiffusionstest sowohl mit D-Cycloserin (Abb.15) als auch mit L-Cycloserin (Abb.14), in chem. reinem Wasser gelöst, durchgeführt. Die Konzentrationen des Cycloserins sind links oben 0,05 M; rechts oben 0,1 M; links unten 0,25 M und rechts unten 0,5 M. Man kann sehr deutlich die Hemmung der Pigmentbildung im Bereich der Diffusionshöfe erkennen. Die unterschiedliche Braunfärbung ist durch den unterschiedlichen Ablesezeitpunkt von vier bzw. sechs Tagen zu erklären. Da eine Hemmwirkung bei D- und L-Cycloserin gegeben ist, wurden die weiteren Versuche aus Kostengründen mit D-Cycloserin durchgeführt.



Abbildung 16: Agardiffusionstest auf Dixon-Agar mit D-Cycloserin.

Abbildung 16 zeigt die vier Tage alte Kultur mit identischem Versuchsansatz auf dem zur Anzucht des Pilzes üblichen Komplettmedium (Dixon-Agar). Eine Pigmentbildung wird nicht induziert, da mehrere Stickstoffquellen zur Verfügung stehen. Das Wachstum des Pilzes ist gleichmäßig.

4.5.2 Plattenverdünnungstest

Abbildung 17 zeigt den Plattenverdünnungstest mit D-Cycloserin. Dieser Stoff hemmt die Pigmentbildung ab einer Konzentration von 0,125 M in chem. reinem Wasser vollständig. Bei diesem Versuch konnte ab der Platte 5 eine Pigmentbildung beobachtet werden. Ein Kontrollansatz ohne Hemmstoff zur Beurteilung der Pigmentbildung wurde mitgeführt.

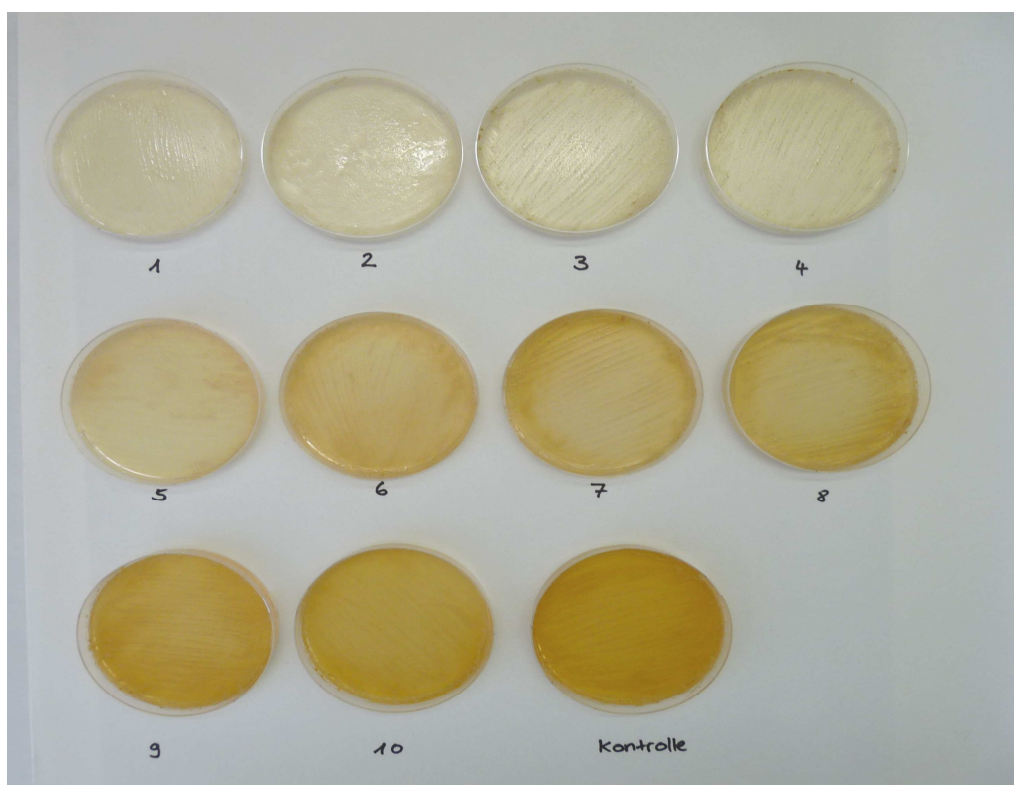


Abbildung 17: Plattenverdünnungstest mit Cycloserin.

Tabelle 1: Konzentrationen Cycloserin

1	1 M	6	~31 mM
2	0,5 M	7	~15 mM
3	0,25 M	8	~8 mM
4	0,125 M	9	~4 mM
5	0,0625 M	10	~2 mM
		11	Kontrolle ohne Hemmstoff

4.5.3 Test im Flüssigmedium

1. Versuch

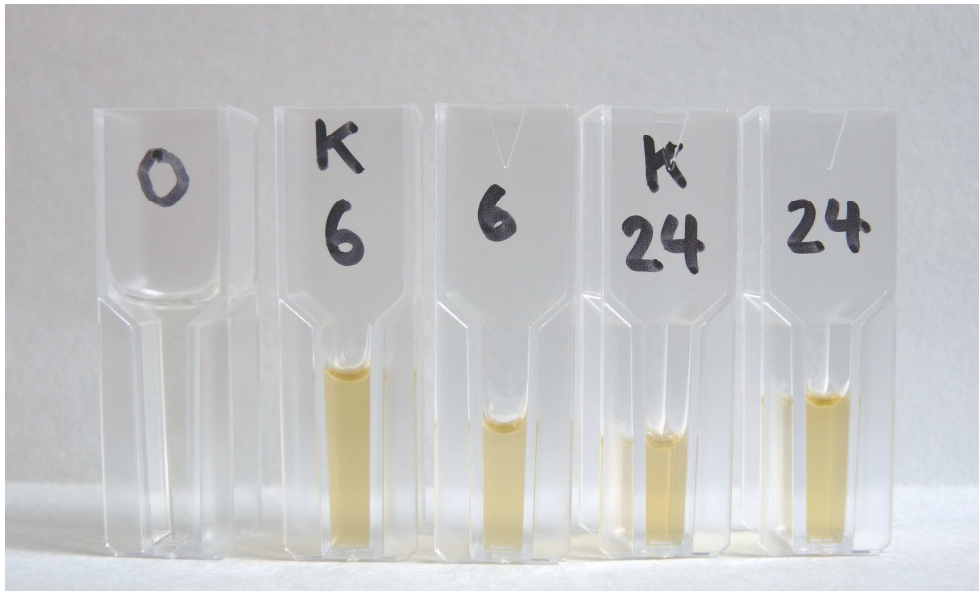


Abbildung 18: 1. Flüssigmediumversuch mit Cycloserin.

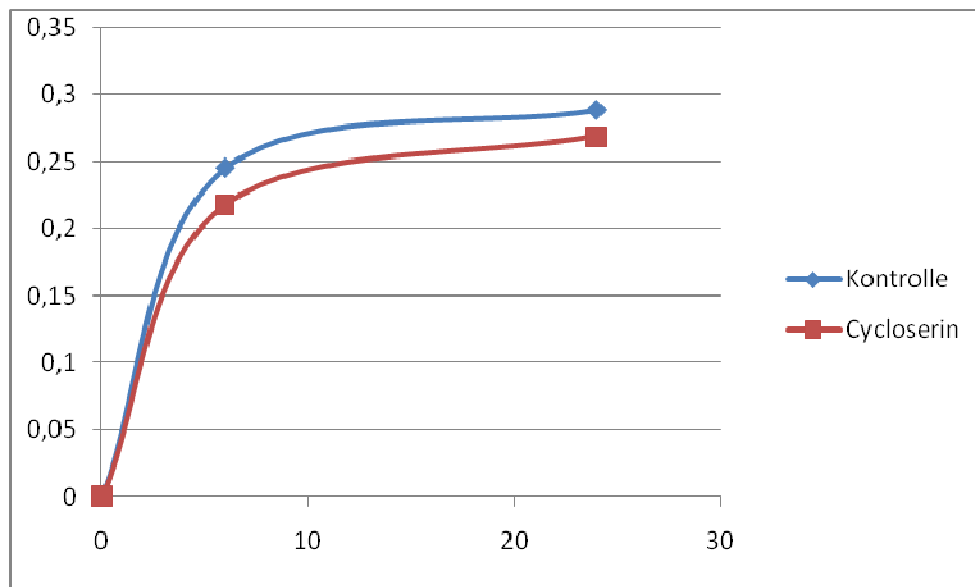


Abbildung 19: Einzelwellenlängenscan bei 600λ. Cycloserin : 0,2 M

2. Versuch

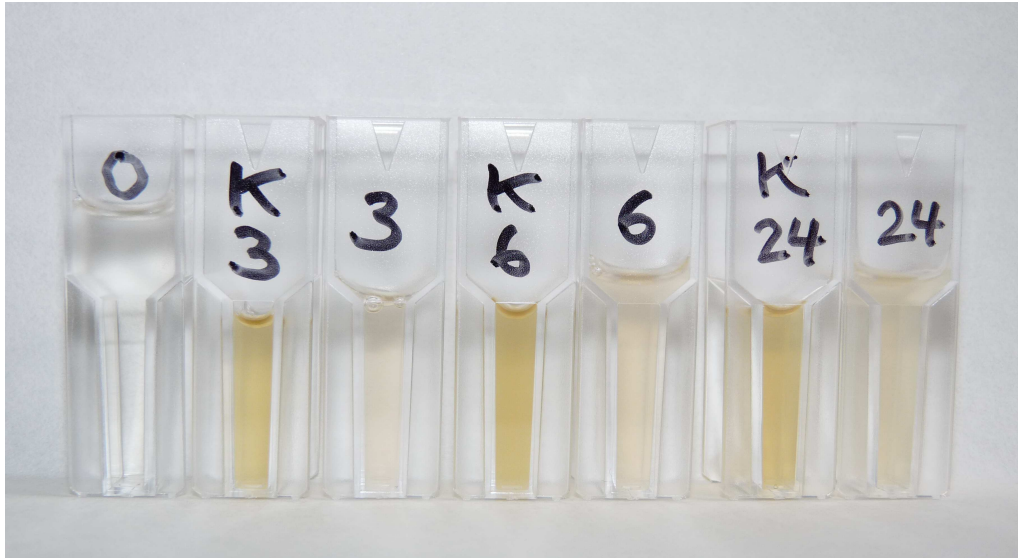


Abbildung 20: 2. Flüssigmediumversuch mit Cycloserin.

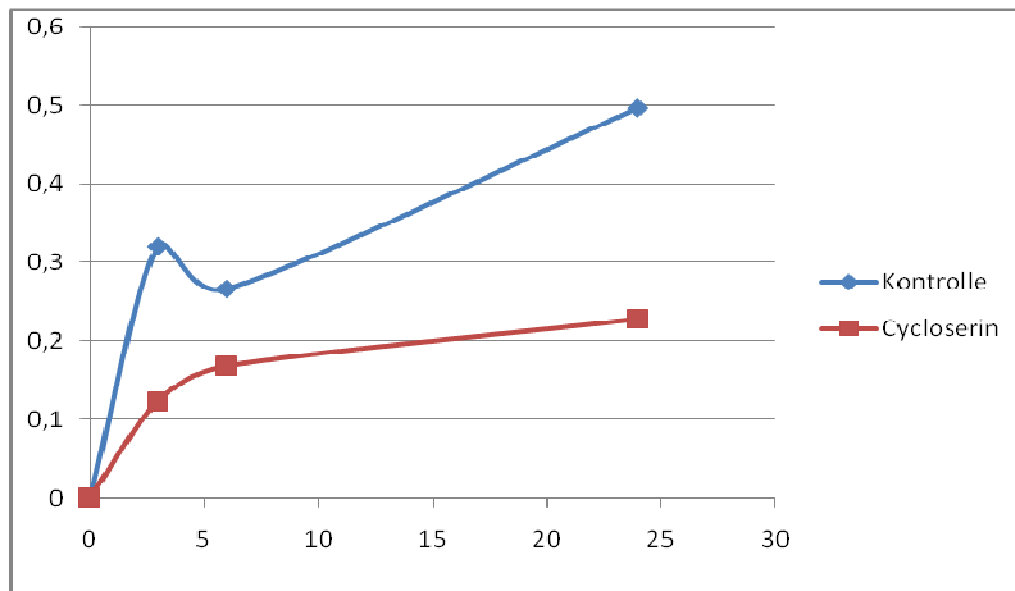


Abbildung 21: Einzelwellenlängenscan bei 600λ. Cycloserin: 0,2 M

Beim ersten Versuch im Flüssigmedium (Abb. 18) ist die Verfärbung des Mediums in beiden Ansätzen deutlich zu erkennen. Bei diesem Versuch wurden 500.000 Zellen pro μl Flüssigmedium gewählt. Rein visuell scheinen die Proben, Kontrollansatz K und der Ansatz mit Cycloserin, gleich stark braun verfärbt zu sein. In Abbildung 18 zeigt der Graph (X-Achse entspricht die Zeit in Stunden, Y-Achse die Extinktion), dass der Kontrollansatz eine leicht höhere Extinktion aufweist, als der Ansatz mit Cycloserin. Nach diesem Versuch folgerten wir, dass die Zellzahl zu hoch für die Gesamtmenge Cycloserin war und die hemmende Wirkung der Pigmentbildung quasi nicht für alle Zellen ausgereicht hatte.

Aus diesem Grund wurde ein zweiter Versuch mit Cycloserin durchgeführt. Die Zellzahl betrug 300.000 Zellen pro μl Flüssigmedium. Die Konzentration des Cycloserins wurde nicht geändert.

Beim zweiten Versuch (Abb. 20) kann man schon mit bloßem Auge erkennen, dass eine Hemmwirkung eingesetzt hat. Die Kontrollansätze (K) zeigen wieder eine Braunfärbung. Auch im Einzelwellenlängenscan kann dies bestätigt werden (Abb. 21).

4.6 Ergebnisse Homoserin

4.6.1 Agardiffusionstest

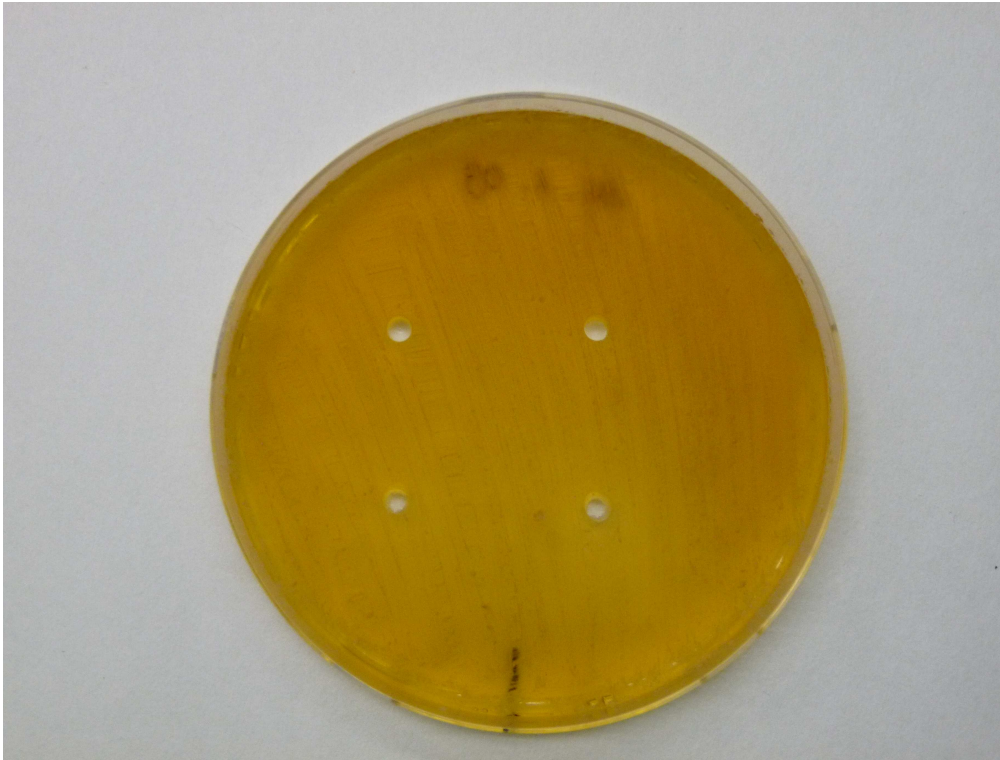


Abbildung 22: Agardiffusionstest mit Homoserin.

Abbildung 22 zeigt den vier Tage alten Agardiffusionstest mit Homoserin in chem. reinem Wasser gelöst. Die Konzentrationen sind: links oben 0,05 M; rechts oben 0,1 M; links unten 0,25 M und rechts unten 0,5 M.

In diesen Konzentrationen ist noch keine deutliche Hemmung der Pigmentbildung erkennbar. Man kann die komplette Braunfärbung der vier Tage alten Kultur auf der Agar-Platte erkennen. Bei einer Konzentration von 0,5 M (rechts unten) kann man einen diskreten Hemmhof erahnen.

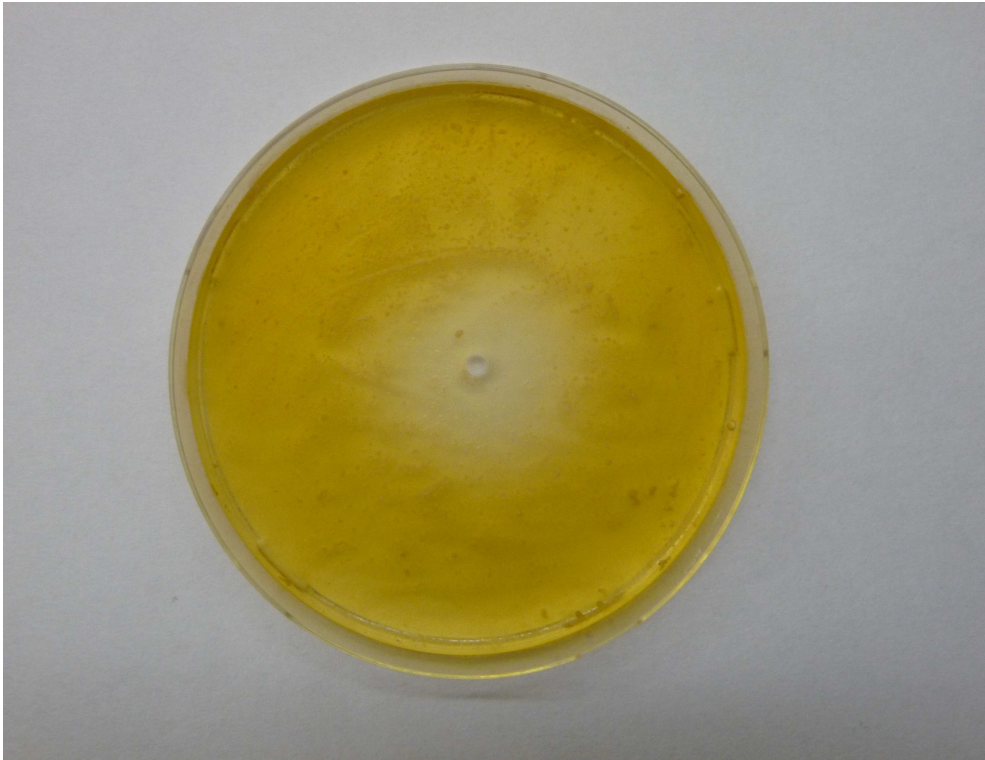


Abbildung 23: Agardiffusionstest mit Homoserin (1 M).

Abbildung 23 zeigt denselben Versuchsansatz wie weiter oben beschrieben, allerdings mit Homoserin in einer Konzentration von 1 M. Es ist ein deutlicher Hemmhof erkennbar.

Der Kontrollansatz auf Dixon-Agar zeigt ein gleichmäßiges Wachstum, auch im Bereich des Diffusionshofes. Es ist kein toxischer Effekt nachweisbar.

4.6.2 Plattenverdünnungstest

Im Plattenverdünnungstest mit Homoserin (siehe Abb.24) konnte in keiner Platte eine vollständige Hemmung festgestellt werden. Die Pigmentbildung wird von Platte 1 bis Platte 10 zunehmend stärker.

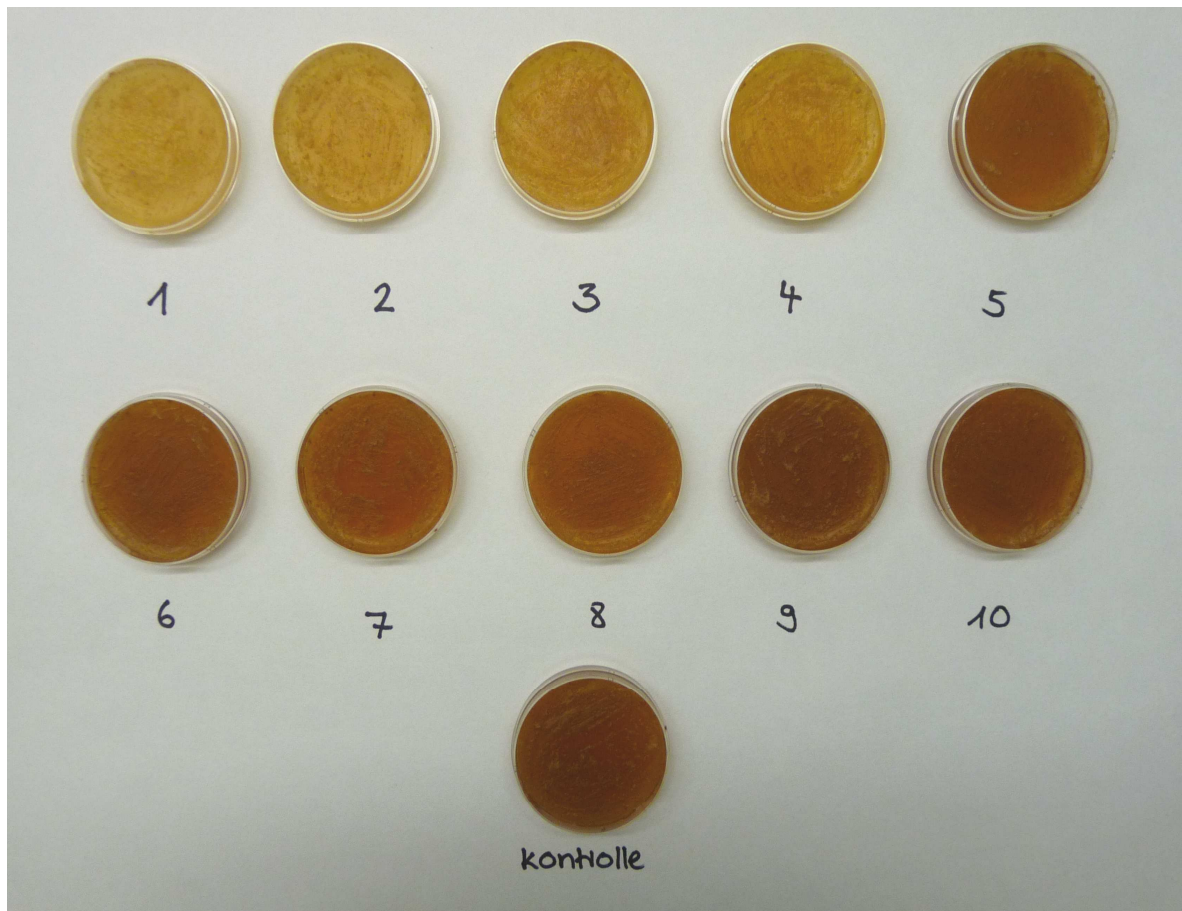


Abbildung 24: Plattenverdünnungstest mit Homoserin.

Tabelle 10: Konzentrationen Homoserin

1	1 M	6	~ 31 mM
2	0,5 M	7	~15 mM
3	0,25 M	8	~8 mM
4	0,125 M	9	~4 mM
5	0,0625 M	10	~2 mM
		11	Kontrolle ohne Hemmstoff

Die Versuche mit Homoserin wurden nicht weitergeführt, da eine vollständige Hemmwirkung nicht erzielt werden konnte und es sich wahrscheinlich auch nur um einen kompetitiven Hemmstoff handelt (siehe Fütterversuch).

4.7 Ergebnisse Terizidon

4.7.1 Vorversuch mit 12-Well-Platte

Nach 24 Stunden war keine Veränderung festzustellen (siehe Abb. 25), erst nach 22 Tagen zeigt sich eine deutliche Pigmentbildung im Kontrollansatz (siehe Abb. 26).

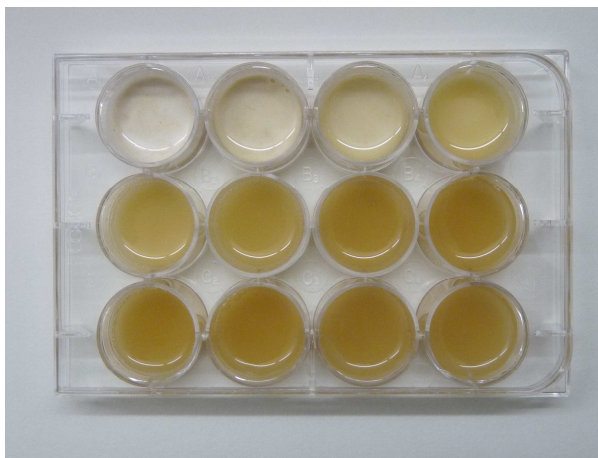


Abbildung 25: Vorversuch mit Terizidon

(Weißverfärbung in hohen Konzentrationen durch Terizidon)

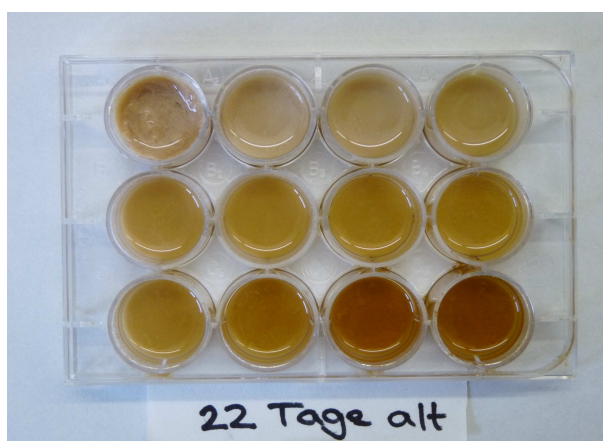


Abbildung 26: Vorversuch mit Terizidon, 22 Tage alt.

Tabelle 11: Konzentrationen Terizidon (Vorversuch)

1 (links oben)	0,5 M	7	~8 mM
2	0,25 M	8	~4 mM
3	0,125 M	9	~2 mM
4	0,0625 M	10	~1 mM
5	~31 mM	11	~0,5 mM
6	~15 mM	12	Kontrolle ohne Hemmstoff

Wie in Kapitel 3.6 beschrieben wurde bei diesem Vorversuch handelsübliche Terizidon Tabletten verwendet. Die Löslichkeit der Tabletten war aufgrund der vorhandenen Füllstoffe sehr schlecht. Dieser Versuch diente zur Orientierung, ob Terizidon ebenfalls eine Hemmwirkung gegenüber Tam 1 aufweist.

Terizidon Tabletten, wie sie in der „Roten Liste“ als Arzneimittel aufgeführt sind, konnten für die geplanten Versuche nicht verwendet werden, da sie einen Füllstoff enthalten. Die Terizidon-Reinsubstanz wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Alt, Fatol Arzneimittel, Schiffweiler (Betriebsstätte der Riemser AG). Bei allen weiteren Versuchen mit Terizidon wurde diese Reinsubstanz verwendet.

4.7.2 Agardiffusionstest

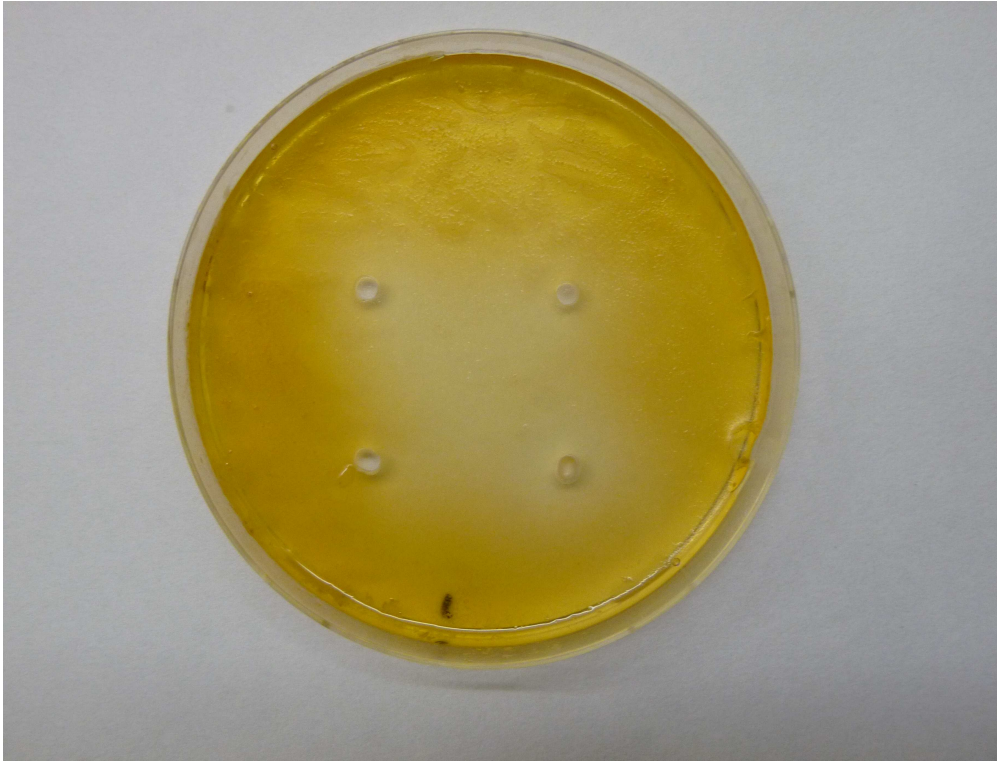


Abbildung 27: Agardiffusionstest auf P-Agar mit Terizidon.

Abbildung 27 zeigt den Agardiffusionstest auf P-Agar mit Terizidon in chemisch reinem Wasser gelöst. Die Konzentrationen sind: links oben 0,05 M; rechts oben 0,1 M; links unten 0,25 M und rechts unten 0,5 M. Man kann auch hier deutlich eine Hemmung der Pigmentbildung im Bereich der Diffusionshöfe erkennen. Der Versuch ist nur eingeschränkt aussagekräftig, da Terizidon nur schwer wasserlöslich ist.

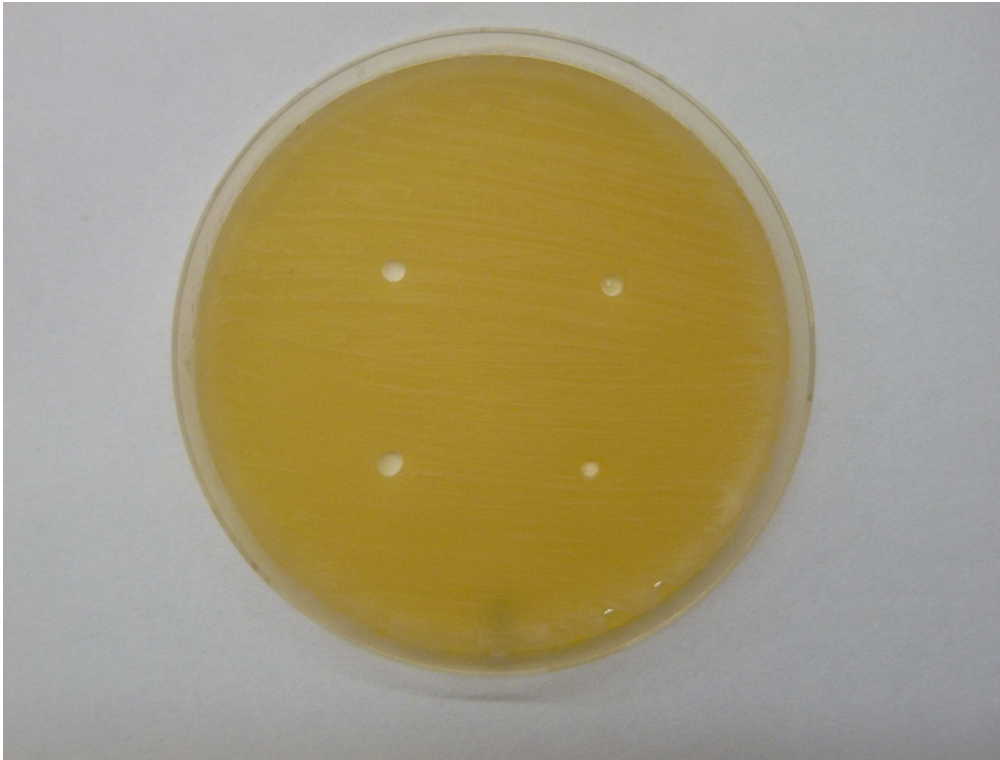


Abbildung 28: Agardiffusionstest auf Dixon-Agar mit Terizidon.

Auch bei diesem Hemmstoff wurde zur Kontrolle ein Agardiffusionstest auf Dixon-Agar durchgeführt (Abb. 28). Eine Pigmentbildung wird nicht induziert, da mehrere Stickstoffquellen zur Verfügung stehen. Das Wachstum des Pilzes ist auf der gesamten Platte gleichmäßig.

4.7.3 Plattenverdünnungstest

Abbildung 29 zeigt den Plattenverdünnungstest mit Terizidon. Dies hemmt die Pigmentbildung ab einer Konzentration von etwa 30 mM vollständig. Bei diesem Versuch konnte ab der Platte Nr. 6 (Tabelle 12) eine Pigmentbildung beobachtet werden. Ein Kontrollansatz ohne Hemmstoff zur Beurteilung der Pigmentbildung wurde mitgeführt. Insgesamt ist dieser Test aussagekräftiger

als der Agardiffusionstest, da in diesem Test Tween als Lösungsvermittler zur Verfügung stand.

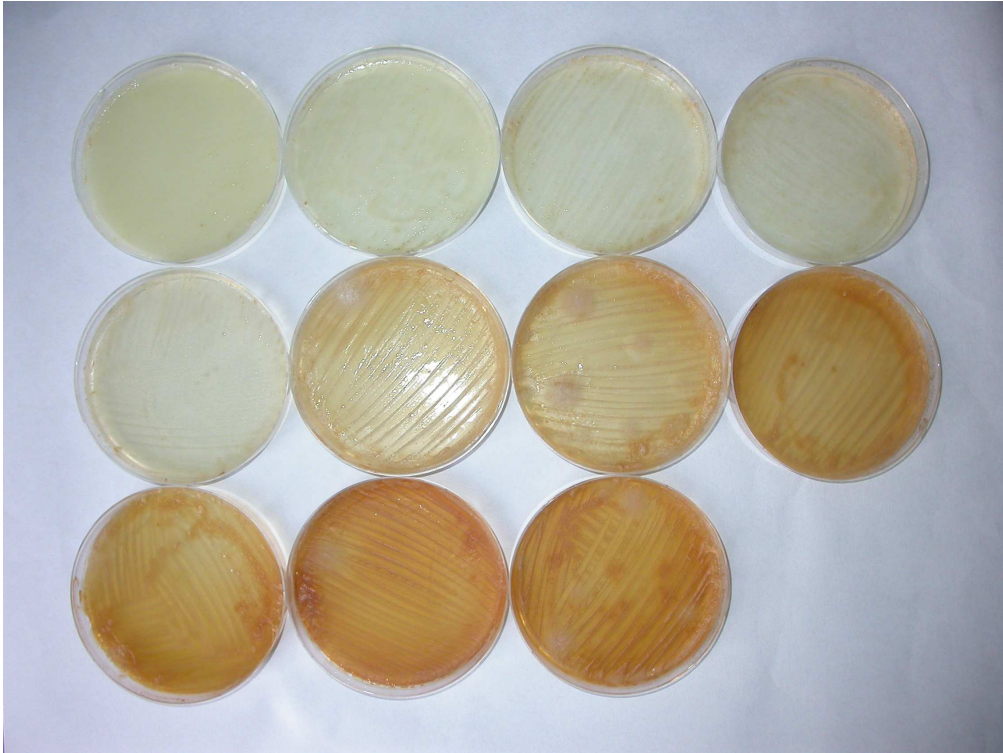


Abbildung 29: Plattenverdünnungstest mit Terizidon.

Tabelle 12: Konzentrationen Terizidon

1	0,5 M	6	~15 mM
2	0,25 M	7	~8 mM
3	0,125 M	8	~4 mM
4	0,0625 M	9	~2 mM
5	~ 31 mM	10	~1 mM
		11	Kontrolle ohne Hemmstoff

(von links oben nach rechts unten)

4.8 Anwendungsversuche mit Cycloserin

Für die Anwendungsversuche mit Cycloserin wurde uns von der Krankenhausapotheke eine Lösung zur Anwendung am Patienten hergestellt. Eine Herstellung unmittelbar vor Anwendung war notwendig, da keine Konservierungsstoffe in der Lösung enthalten sein sollten und Cycloserin in wässriger Lösung instabil ist.

Als Konzentration für die Versuche wurden 0,2 M gewählt, da in dieser Konzentration im Plattenverdünnungstest eine komplette Hemmung der Pigmentbildung zu beobachten war. Bei der Anwendungshäufigkeit von zweimal täglich für 5 Tage orientierten wir uns an den bisherigen Therapien der Pityriasis versicolor mit Antimykotika.

Patient 1: L. D., *23.09.1989

- **Allgemeine Anamnese**

Die allgemeine Anamnese ist unauffällig.

- **Spezielle Anamnese**

Der Patient leidet seit acht Jahren unter Pityriasis versicolor alba. Der Patient spielt American Football und trägt bei diesem Sport Trikots aus Kunststoff. Die Familienanamnese ist positiv, der Vater und der Bruder leiden ebenfalls unter PV.

- **Klinisches Bild**

Im klinischen Befund ist deutlich die Pityriasis versicolor alba zu erkennen. Es liegt keine Schuppung vor. Das Nativpräparat war Hyphen negativ.

- **Fotodokumentation**



Abbildung 30: Patient 1, vor der Therapie.

Ausgedehnte PV alba mit nur geringer Schuppung



Abbildung 31: Patient 1, nach der Therapie.

In Abbildung 30 und Abbildung 31 ist die rechte Oberkörperhälfte des Patienten zu erkennen. Abbildung 30 zeigt den Zustand vor der Therapie, Abbildung 31 nach der fünf-tägigen Anwendung mit Cycloserin. Die Bilder zeigen deutlich, dass sich durch die Cycloserin-Therapie keine Verbesserung der PV alba ergeben hat. Der Patient empfand auch nur eine geringfügige Besserung (s. Patiententagebuch).

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Klinikums der
JLU Giessen, Gaffkystr. 14, 35385 Giessen

Sehr verehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie haben von uns 50ml einer Lösung zum Einreiben der aufgezeichneten Hautregion erhalten. Die Anwendung sollte **2x** tgl. über 5 Tage erfolgen, morgens und abends nach dem Duschen oder Waschen. Pro Tag sollten nicht mehr als 10ml verwendet werden. Bitte bewahren Sie die Lösung zwischenzeitlich im Kühlschrank auf.

Notieren Sie bitte in diesem Bogen, wenn Sie Veränderungen an Ihrer Haut feststellen. Vielen Dank

L. D. 130

Patiententagebuch

Datum der Erstuntersuchung: 6.5.09

Tag	Juckreiz	Rötung	Schuppung	+/- *	Bemerkungen
1	-	-	-	0	/
2	-	-	-	0	/
3	leicht	-	-	+1	/
4	leicht	klein	-	+2	/
5	leicht	minimale	-	+2	/

* Veränderung zum Ausgangsbefund = 0; + (max. bis +10) = Verbesserung; - (max. bis -10) = Verschlechterung

Datum des 1. Kontrolltermins: 13.5.13⁰⁰

Datum des 2. Kontrolltermins: 20.5.11⁰⁰

Bitte bringen Sie diesen Bogen und die angebrochene Flasche zu den Kontrollterminen mit!

Abbildung 32: Patient 1, Patiententagebuch.

Patient 2: M.-R. B., *31.12.1989

- **Allgemeine Anamnese**

Die allgemeine Anamnese ist unauffällig.

- **Spezielle Anamnese**

Der Patient leidet seit über sieben Jahren unter Pityriasis versicolor alba.

Der Patient spielt American Football und trägt bei diesem Sport Trikots aus Kunststoff.

Als Provokationsfaktoren gibt er Fast food, Alkohol und Schwitzen an. Die Familienanamnese ist positiv, seine Mutter ist ebenfalls an PV erkrankt.

- **Klinisches Bild**

Im klinischen Befund ist deutlich die Pityriasis versicolor alba zu erkennen.

Es liegt keine Schuppung vor. Das Nativpräparat war Hyphen negativ.

- **Fotodokumentation**



Abbildung 33: Patient 2, vor der Therapie. Ausgedehnte PV alba.



Abbildung 34: Patient 2, nach fünftägiger Therapie.

Die Abbildungen 33 und 34 zeigen den betroffenen Oberkörper des Patienten. Auch in diesem Fall kann man nach der Therapie mit Cycloserin keine Verbesserung der Situation feststellen.

(Anmerkung: Der Patient hat kein „Patiententagebuch“ geführt.)

Patient 3: S. S., *20.04.1973**▪ Allgemeine Anamnese**

Der Patient leidet unter Heuschnupfen, ansonsten ist die Anamnese unauffällig. Er nimmt keine Medikamente.

▪ Spezielle Anamnese

Der Patient stellte sich am 25.03.2009 in der Poliklinik für Dermatologie zur Entfernung eines Nävus im Bauchnabel vor. Bei der Untersuchung wurde die Pityriasis versicolor am Oberkörper, vor allem an den Schultern und am Rücken des Patienten entdeckt. Laut Patient besteht die PV seit über zehn Jahren. Als Provokationsfaktor gibt er starkes Schwitzen an. In seiner Familie ist sein Cousin ebenfalls an PV erkrankt.

▪ Nativpräparat

Das Nativpräparat war Hyphen positiv. Man kann deutlich im Bild die Hyphen neben den runden Hefezellen erkennen („Spaghetti und Fleischklößchen“-Struktur).

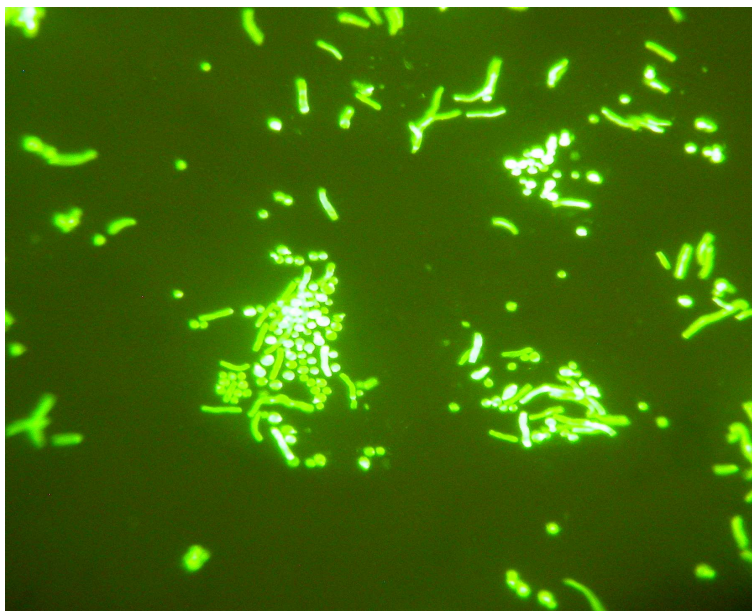


Abbildung 35: Patient 3, Nativpräparat.

- **Screening Ausgangsbefund**

Beim Ausgangsbefund breitete sich PV vor allem auf dem Rücken und den Schultern aus. Es ist im klinischen Bild eine starke Schuppung und eine Pigmentbildung zu erkennen.

- **Fotodokumentation**

Ausgangsbefund



Abbildung 36: Patient 3, rechte Schulter des Patienten vor der Therapie

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Klinikums der
JLU Giessen, Gaffkystr. 14, 35385 Giessen

Sehr verehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie haben von uns 50ml einer Lösung zum Einreiben der aufgezeichneten
Hautregion erhalten. Die Anwendung sollte 2x tgl. über 5 Tage erfolgen, morgens
und abends nach dem Duschen oder Waschen. Pro Tag sollten nicht mehr als 10ml
verwendet werden. Bitte bewahren Sie die Lösung zwischenzeitlich im Kühlschrank
auf.

Notieren Sie bitte in diesem Bogen, wenn Sie Veränderungen an Ihrer Haut
feststellen. Vielen Dank

Patiententagebuch

Datum der Erstuntersuchung: 6.5.09

Tag	Juckreiz	Rötung	Schuppung	+/- *	Bemerkungen
1 07/05/09	/	/	/	0	leichtes Brennen
2 08/05/09	/	/	/	+2	leichtes Brennen
3 09/05/09	/	/	/	+5	/
4 10/05/09	/	/	/	+6	/
5 11/05/09	/	/	/	+8	/

* Veränderung zum Ausgangsbefund = 0; + (max. bis +10) = Verbesserung; - (max. bis -10) = Verschlechterung

Datum des 1. Kontrolltermins: 13.5.09 17⁵⁰

Datum des 2. Kontrolltermins: 19.5.09 18⁰⁰

Bitte bringen Sie diesen Bogen und die angebrochene Flasche zu
den Kontrollterminen mit!

Abbildung 37: Patient 3, Patiententagebuch

Wie der Patient in seinem Tagebuch vermerkte, setzte eine Besserung schon ab dem 2. Tag der Anwendung ein. In den ersten zwei Tagen verspürte er nach dem Einreiben der Cycloserin-Lösung ein leichtes Brennen auf der Haut.

Bei dem ersten Kontrolltermin nach sieben Tagen war klinisch eine deutliche Verbesserung zu erkennen. Die Schuppung und die Pigmentbildung gingen stark zurück. Diese wurde auch von dem Patienten so empfunden (Abb. 38).

▪ **Fotodokumentation**

nach fünftägiger Anwendung von Cycloserin



Abbildung 38: Patient 3, rechte Schulter des Patienten nach der Therapie.



vor Behandlung



nach fünf-tägiger Behandlung

Abbildung 39: Patient 3, Vergleich im Detail

Es wurde ein Agardiffusionstest der verwendeten Lösung als Kontrolle durchgeführt, in diesem ist ein deutlicher Hemmhof zu erkennen.

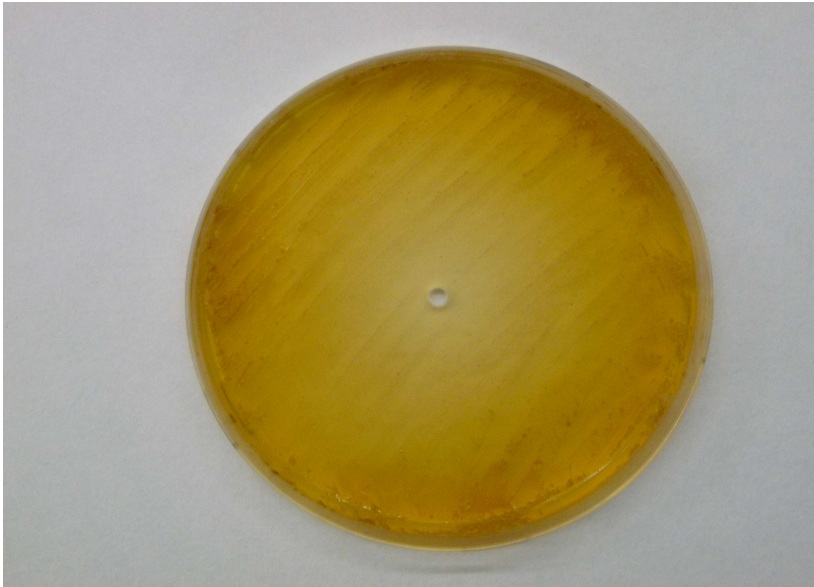


Abbildung 40: Patient 3, Agardiffusionstest.

Patient 4: S. H., *07.12.1963

- **Allgemeine Anamnese**

Die allgemeine Anamnese ist unauffällig, es besteht im Sommer eine leichte Sonnenallergie.

- **Spezielle Anamnese**

Seit ca. zwei Wochen bestehe laut Patientin diese Pityriasis versicolor. Sie gibt an, vorher noch nie an PV erkrankt zu sein.

- **Klinisches Bild**

Im klinischen Befund ist eine Pityriasis versicolor auf dem Rücken (rechts) zu erkennen; es ist bei dieser Patientin auf ein Dermatom begrenzt.

Das Nativpräparat war positiv, es war deutlich die „Spaghetti mit Fleischklößchen“-Struktur zu erkennen.

- **Fotodokumentation**

vor der Behandlung



Abbildung 41: Patient 4, vor der Behandlung.

- **Fotodokumentation**
nach der Behandlung



Abbildung 42: Patient 4, nach der Behandlung

Auch in diesem Fall verbesserte sich die Erkrankung deutlich. Nach der fünftägigen Anwendung ist klinisch keine PV-Läsion mehr erkennbar.

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Klinikums der
JLU Giessen, Gaffkystr. 14, 35385 Giessen

Sehr verehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie haben von uns 50ml einer Lösung zum Einreiben der aufgezeichneten Hautregion erhalten. Die Anwendung sollte 2x tgl. über 5 Tage erfolgen, morgens und abends nach dem Duschen oder Waschen. Pro Tag sollten nicht mehr als 10ml verwendet werden. Bitte bewahren Sie die Lösung zwischenzeitlich im Kühlschrank auf.

Notieren Sie bitte in diesem Bogen, wenn Sie Veränderungen an Ihrer Haut feststellen. Vielen Dank.

S. H.

Patiententagebuch

Datum der Erstuntersuchung: 3.6.09

Tag	Juckreiz	Rötung	Schuppung	+/- *	Bemerkungen
1	abends ein wenig	nein	etwas	+1	
2	nein	nein	etwas	+5	bis auf 3 kleine Stellen weg
3	nein	nein	etwas	+2	"
4	nein	nein			
5	nein	nein			

* Veränderung zum Ausgangsbefund = 0; + (max. bis +10) = Verbesserung; - (max. bis -10) = Verschlechterung

Datum des 1. Kontrolltermins: 19.6.09 10⁰⁰ Uhr

Datum des 2. Kontrolltermins: 17.6.09 10⁰⁰ Uhr

Bitte bringen Sie diesen Bogen und die angebrochene Flasche zu den Kontrollterminen mit!

Abbildung 43: Patient 4, Patiententagebuch.

Patient 5: M. M., *04.03.1986**▪ Allgemeine Anamnese**

Die allgemeine Anamnese ist unauffällig, es bestehen Allergien gegen Gräser und Birke.

▪ Spezielle Anamnese

Seit ca. zwei Monaten ist der Patient an Pityriasis versicolor erkrankt.

▪ Klinisches Bild

Im klinischen Befund ist deutlich eine Pityriasis versicolor auf dem Rücken und an den Flanken rechts und links zu erkennen. Es besteht eine starke Schuppung und Pigmentbildung.

Das Nativpräparat war positiv, es war deutlich die „Spaghetti mit Fleischklößchen“-Struktur zu erkennen.

**▪ Fotodokumentation
vor der Behandlung**

Abbildung 44: Patient 5, linke Körperseite vor der Behandlung.

- **Fotodokumentation**
nach der Behandlung



Abbildung 45: Patient 5, linke Körperseite nach der Behandlung.

Der Patient vermerkte in seinem Patiententagebuch eine deutliche Verbesserung ab dem dritten Tag. Bei der Kontrolle nach sieben Tagen zeigte sich klinisch eine deutliche Besserung, es sind keine Läsionen mehr zu erkennen.

Bei der **unbehandelten** (rechten) Körperseite waren keine Veränderungen feststellbar.

2. Therapieansatz:

Im Folgenden wurde nun auch die rechte Körperseite in gleicher Weise behandelt.

Vor der Therapie:



Abbildung 46: Patient 5, rechte Körperseite - vor der Therapie.

Nach der Therapie:



Abbildung 47: Patient 5, rechte Körperseite - nach der Therapie.

Auch hier ist eine deutliche Minderung der Pigmentierung zu erkennen.

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Klinikums der
JLU Giessen, Gaffkystr. 14, 35385 Giessen

M. M.

Sehr verehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie haben von uns 50ml einer Lösung zum Einreiben der aufgezeichneten Hautregion erhalten. Die Anwendung sollte 2x tgl. über 5 Tage erfolgen, morgens und abends nach dem Duschen oder Waschen. Pro Tag sollten nicht mehr als 10ml verwendet werden. Bitte bewahren Sie die Lösung zwischenzeitlich im Kühlschrank auf.

Notieren Sie bitte in diesem Bogen, wenn Sie Veränderungen an Ihrer Haut feststellen. Vielen Dank.

Patiententagebuch

Datum der Erstuntersuchung: 9.6.09

Tag	Juckreiz	Rötung	Schuppung	+/- *	Bemerkungen
1	/	/	/	/	keine sichtbare Veränderung
2	/	/	/	+	
3	/	/	/	+	saum mehr sichtbar
4	/	/	/	++	
5	/	/	/	++	

* Veränderung zum Ausgangsbefund = 0; + (max. bis +10) = Verbesserung; - (max. bis -10) = Verschlechterung

Datum des 1. Kontrolltermins: 16.6.09 14⁰⁰

Datum des 2. Kontrolltermins:

Bitte bringen Sie diesen Bogen und die angebrochene Flasche zu den Kontrollterminen mit!

Abbildung 48: Patient 5, Patiententagebuch.

Patient 6: T. K., *29.07.1964**▪ Allgemeine Anamnese:**

Die allgemeine Anamnese ist unauffällig, es bestehen Allergien gegen Tierhaare und Hausstaub.

▪ Spezielle Anamnese

Der Patient leidet seit mehr als drei Jahren an Pityriasis versicolor. Als Provokationsfaktor gibt er Schwitzen an.

▪ Klinisches Bild

Im klinischen Befund ist deutlich eine Pityriasis versicolor auf dem Rücken und auf der Brust zu erkennen. Es besteht eine starke Schuppung und Pigmentbildung in den Läsionen.

Das Nativpräparat war positiv, es war deutlich die „Spaghetti mit Fleischklößchen“-Struktur zu erkennen.

▪ Fotodokumentation

vor der Behandlung



Abbildung 49: Patient 6, vor der Behandlung.

- **Fotodokumentation**
nach der Behandlung:



Abbildung 50: Patient 6, nach der Behandlung.

- **Detailansichten:**

Vor der Therapie



Nach der Therapie



Abbildung 51: Patient 6, Detailansichten - vor und nach der Therapie.

Auch in diesem Falle ergab sich durch die Therapie mit Cycloserin eine Verbesserung der Pityriasis versicolor. Im Rückenbereich ist nach der Anwendung eine leichte Depigmentierung zu erkennen.

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Klinikums der
JLU Giessen, Gaffkystr. 14, 35385 Giessen

Sehr verehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie haben von uns 50ml einer Lösung zum Einreiben der aufgezeichneten Hautregion erhalten. Die Anwendung sollte 2x tgl. über 5 Tage erfolgen, morgens und abends nach dem Duschen oder Waschen. Pro Tag sollten nicht mehr als 10ml verwendet werden. Bitte bewahren Sie die Lösung zwischenzeitlich im Kühlschrank auf.

Notieren Sie bitte in diesem Bogen, wenn Sie Veränderungen an Ihrer Haut feststellen. Vielen Dank.

T. K.

Patiententagebuch

Datum der Erstuntersuchung: 03.07.09

Tag	Juckreiz	Rötung	Schuppung	+/- *	Bemerkungen
1	✓	✓		0	
2	✓	✓		+2	wird heller
3	weniger	geht weg		+3	wird heller
4	kein	fast weg		+6	kann wieder zu finden
5	kein	fast weg		+7	

* Veränderung zum Ausgangsbefund = 0; + (max. bis +10) = Verbesserung; - (max. bis -10) = Verschlechterung

Datum des 1. Kontrolltermins: nächst Do 10⁰⁰

Datum des 2. Kontrolltermins:

Bitte bringen Sie diesen Bogen und die angebrochene Flasche zu den Kontrollterminen mit!

Abbildung 52: Patient 6, Patiententagebuch.

Patient 7: K. A., *26.11.1984**▪ Allgemeine Anamnese**

Der Patient leidet seit sechs Jahren unter Morbus Crohn, er nimmt gegenwärtig Cortison-Tabletten ein. Es bestehen Allergien gegen diverse Nahrungsmittel (Soja, Seelachs, Erdnuss, Karotte, Maismehl, Weizenmehl).

▪ Spezielle Anamnese

Der Patient bemerkte die Pityriasis versicolor vor ca. einem Monat. Es sind keine Provokationsfaktoren bekannt.

▪ Klinisches Bild

Im klinischen Befund ist deutlich eine Pityriasis versicolor auf der Brust zu erkennen. Es besteht eine geringe Schuppung. Da der Patient stark sonnengebräunt ist, erscheinen die PV-Läsionen hell. Das klinische Bild spricht für eine Pityriasis versicolor alba.

Das Nativpräparat war positiv; es war deutlich die „Spaghetti mit Fleischklößchen“-Struktur zu erkennen.

▪ Fotodokumentation

vor der Behandlung



Abbildung 53: Patient 7, vor der Behandlung

**.Fotodokumentation
nach der Behandlung**



Abbildung 54: Patient 7, nach der Behandlung.

Bei diesem Patienten konnte keine Verbesserung der Läsionen festgestellt werden, die PV ist vermutlich gerade in die depigmentierte Form übergegangen. Das Nativpräparat war positiv, das klinische Bild entsprach aber einer PV alba.

Hier konnte die Cycloserinlösung wie auch bei Patient 1 und 2 keine Wirkung erzeugen.

(Anmerkung: Der Patient hat kein „Patiententagebuch“ geführt.)

4.9 Agardiffusionstest mit anderen *Malassezia* Stämmen

Ist Tryptophan die einzige Stickstoffquelle im Nährboden, so bildet nicht nur die Spezies *Malassezia furfur* ein braunes Pigment (Mayser et al., 1998), sondern auch einige Stämme der Spezies *Malassezia pachydermatis* (Mayser et al., 2004). Es wurden daher differente Stämme *Malassezia furfur*, *Malassezia pachydermatis* und *Malassezia sympodialis* auf die Hemmstoffe Cycloserin und Aminooxyacetat in der Konzentration von 0,5 molar getestet.

Bei den *Malassezia furfur* bildeten die Stämme *Malassezia furfur* 4167 und 4170 kein Pigment, eine Hemmwirkung von Aminooxyacetat und Cycloserin konnte demnach nicht untersucht werden. Die Stämme *Malassezia furfur* 5332, 5334 und 6094 und *Malassezia sympodialis* 7222, 7979 und ATCC 42132 wuchsen nicht auf dem Agar, demnach konnte auch keine Hemmwirkung untersucht werden. Alle anderen *Malassezia furfur*-Stämme (siehe Tabelle 14) zeigten ein ausgesprochen gutes Wachstum auf dem P-Agar, bildeten Pigmente und zeigten eine deutliche Hemmung der Pigmentbildung durch Cycloserin und Aminooxyacetat.

Tabelle 13: Agardiffusionstest mit anderen *Malassezia* Stämmen

Name	Wachstum	Pigmentbildung	Hemmung Aminooxyacetat	Hemmung Cycloserin
<i>Malassezia furfur</i> 1878	+	++	++	++
<i>M. furfur</i> S.311	+	+	+	+
<i>M. furfur</i> S 312	+	+	+	+
<i>M. furfur</i> S 313	++	++	+	++
<i>M. furfur</i> S 314	+	+	+	+

Name	Wachstum	Pigmentbildung	Hemmung Aminooxyacetat	Hemmung Cycloserin
<i>M. furfur</i> S 315	+	+	+	+
<i>M. furfur</i> S 316	+	+	+	+
<i>M. furfur</i> S 317	+	++	+	+
<i>M. furfur</i> MFZ 1	+	+	+	+
<i>M. furfur</i> MFZ 2	+	++	+	+
<i>M. furfur</i> Leiden	+	+	+	+
<i>M. furfur</i> 4162	+	+	+	+
<i>M. furfur</i> 4167	(+)	-	-	-
<i>M. furfur</i> 4170	(+)	-	-	-
<i>M. furfur</i> 4171	+	+	+	+
<i>M. furfur</i> 5332	-	-	-	-
<i>M. furfur</i> 5334	-	-	-	-
<i>M. furfur</i> 6000	+	+	++	++
<i>M. furfur</i> 6001	+	+	+	++
<i>M. furfur</i> 6034	+	+	++	++
<i>M. furfur</i> 6046	+	+	+	++
<i>M. furfur</i> 6094	-	-	-	-
<i>M. furfur</i> 7019	++	++	+	+
<i>M. furfur</i> EG 658	+	+	+	+
<i>M. furfur</i> Pi 3435	++	++	+	+

<i>M. pachydermatis</i> 1879	+	+	+	+
<i>M. sympodialis</i> 7222	-	-	-	-
<i>M. sympodialis</i> 7979	-	-	-	-
<i>M. sympodialis</i> ATCC 42132	-	-	-	-

++ sehr gut, + gut, (+) schlecht, - kein Wachstum bzw. keine Hemmwirkung

4.10 Agardiffusionstest mit verschiedenen Candida Stämmen

Da seit dem Jahr 2007 bekannt ist, dass die Hefen *Candida glabrata* ebenso wie die *Malassezia furfur* Stämme Indol-Pigmente produzieren (Mayser et al., 2007), wurde der Agardiffusionstest mit verschiedenen Candida Arten durchgeführt. Es wurden die vier bekannten Hemmstoffe Aminooxyacetat, Cycloserin, Homoserin und Terizidon in der Konzentration 0,5 molar getestet. Alle untersuchten *Candida glabrata* Stämme zeigten in den durchgeführten Versuchen eine Hemmung durch die getesteten Stoffe. Auch einige andere Candida Stämme, wie *Candida pararugosa*, *Candida magnoliae* und *Candida norvegica* zeigten eine Hemmung der Pigmentbildung. Das Ergebnis aller Candida Stämme ist in Tabelle 15 ersichtlich. Die Ergebnisse lassen sich nur orientierend verwenden. Bei Wiederholungen kam es teilweise zu abweichenden Resultaten.

Tabelle 14: Agardiffusionstest mit verschiedenen Candida Stämmen

Pilz	Wachstum auf 1 b Agar	Wachstum und Pigment- bildung auf 1 b Agar	Hemmung Amino- oxyacetat	Hemmung Cycloserin	Hemmung Homoserin	Hemmung Terizidon
<i>Candida albicans</i> CBS 562	+	-	-	-	-	-
<i>C. albicans (rot)</i> P1880	+	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (glatt)	+	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (rauh)	+	-	-	-	-	-
<i>Issat.orientalis</i> CBS 573	+	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i> (Hamb.)	+	+	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> RV08/05	+	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i> CBS 138	+	+	+	+	+	+
<i>C. africana</i> P1323	+	-	-	-	-	
<i>C. intermedia</i> P2327	+	-	-	-	-	-
<i>C.pararugosa</i> P2224	+	+	+	+	+	+
<i>C. magnoliae</i> P616	+	+	+	+	+	+
<i>C. lusitaniae</i> P1576	+	-	-	-	-	-
<i>C. steatolytica</i> 17	+	-	-	-	-	-

Pilz	Wachstum auf 1 b Agar	Wachstum und Pigment- bildung auf 1 b Agar	Hemmung Amino- oxyacetat	Hemmung Cycloserin	Hemmung Homoserin	Hemmung Terizidon
<i>C. pseudointer- media</i> 2103	+	-	-	-	-	-
<i>C. pseudointer- media</i> 2339	+	-	-	-	-	-
<i>C. viswanathii</i> 1582	+	-	-	-	-	-
<i>C. valida</i> 1920	+	-	-	-	-	-
<i>C. valida</i> 1537	+	-	-	-	-	-
<i>C. blankii</i> P2393	+	+	-	-	-	-
<i>C. allociferri</i> P2331	+	-	-	-	-	-
<i>C. catenulata</i> P2406	+	-	-	-	-	-
<i>C. cacaoi</i> P2369	+	+	+	+	-	+
<i>C. boidinii</i> P2090	+	-	-	-	-	-
<i>C. humicolata</i> P35	+	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i> rot P1911	+	+	-	-	-	-
<i>C. falce</i> P61	+	-	-	-	-	-
<i>C. lambica</i> P1919	+	-	-	-	-	-
<i>C. kefir</i> 46 404/04	+	-	-	-	-	-
<i>C. zeylanoides</i> P2392	+	+	+	+	-	+
<i>C. norvegica</i> 155C	+	+	+	+	+	+

Pilz	Wachstum auf 1 b Agar	Wachstum und Pigment- bildung auf 1 b Agar	Hemmung Amino- oxyacetat	Hemmung Cycloserin	Hemmung Homoserin	Hemmung Terizidon
<i>C. robusta</i>	+	+	-	-	-	-
<i>C. lipolytica</i> 35A	+	+	-	+	-	-
<i>C. dublinensis</i> RV 07	+	-	-	-	-	-
<i>C. famata</i> 139b	+	+	-	-	-	-
<i>C. sphaerica</i> 1986/05	+	+	-	-	-	-
<i>C. pelliculosa</i>	+	-	-	-	-	-
<i>C. pseudo- tropicalis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5015/04	+	+	-	-	-	-
<i>Picchia manshumia</i> P2223	+	-	-	-	-	-
<i>Picchia etchellsii</i> P612	+	-	-	-	-	-
<i>Picchia jardinii</i> P2182	+	-	-	-	-	-
<i>Schizosacch. pombe</i> F617	+	+	-	-	-	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Rhodoturola rubra (glatt)</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Rhodoturola rubra (rauh)</i>	-	-	-	-	-	-

Pilz	Wachstum auf 1 b Agar	Wachstum und Pigment- bildung auf 1 b Agar	Hemmung Amino- oxyacetat	Hemmung Cycloserin	Hemmung Homoserin	Hemmung Terizidon
<i>C.glabrata</i> CBS 138	+	+	+	+	+	+
<i>C.glabrata</i> rot	+	+	+	+	+	+
<i>C.glabrata</i> SK (20.20.08)	+	+	+	+	+	+
<i>C.glabrata</i> SK (10.06.08)	+	+	+	+	+	+
<i>C.glabrata</i> SK (25.04.08)	+	+	+	+	+	+
<i>C.robusta</i> 3/P/2	+	+	-	-	-	-

5 DISKUSSION

Diese Arbeit untersucht die Wirkung von Transaminase-Inhibitoren auf die Pigmentbildung von *Malassezia furfur*. Im Jahr 1998 wurde erstmalig das Phänomen der Pigmentbildung durch Verstoffwechslung der Aminosäure Tryptophan bei Vorhandensein als alleinige Stickstoffquelle beschrieben (Mayser 1998). Die Bildung der Pigmente könnte die klinisch verschiedenen Ausprägungen der Pityriasis versicolor, einer häufigen *Malassezia* assoziierten Erkrankung, erklären. Einige dieser Pigmente wurden genauer untersucht, ihre chemische Struktur ermittelt und mögliche Wirkungen aufgezeigt (Mayser et al., 2002, Irlinger 2005, Krämer et al., 2005, Machowinski 2006). Untersuchungen an dem mit *Malassezia furfur* verwandten Organismus *Ustilago maydis* haben gezeigt, dass zur Biosynthese der komplexen Indolderivate aus Tryptophan nur ein einziger enzymatisch katalysierter Schritt notwendig ist (Zuther et al., 2008). Dieser Schritt, die Desaminierung von Tryptophan zu Indolpyruvat, wird in *Ustilago maydis* von der Tryptophan-Aminotransferase TAM 1 katalysiert und legt nahe, dass diese für die tryptophanabhängige Pigmentbildung verantwortlich ist. Ein ähnliches Enzym wurde auch in *Malassezia*-Hefen gefunden, seine Struktur wird derzeit noch weiter untersucht.

Es stellt sich die Frage, ob durch den Einsatz eines Tryptophan-Aminotransferase-Inhibitors die Pigmentbildung von *Malassezia furfur* unterbunden werden kann und welche Auswirkung dies auf den Verlauf und die Ausprägung der Pityriasis versicolor hat. Mit den bisherigen Behandlungsmethoden kann die Erkrankung zwar vorübergehend und symptomatisch behandelt werden, eine Heilung ist jedoch nicht möglich. Dies

liegt daran, dass immer einige Hefepilze auf der Haut zurückbleiben, die ein erneutes Ausbrechen der Erkrankung auslösen können.

Die meisten Patienten empfinden insbesondere die depigmentierten Hautareale als störend. Haben sich diese erst einmal gebildet, zeigt auch eine medikamentöse Behandlung keine Wirkung (Thoma et al., 2005). Auch wenn der Pilz durch Antimykotika wie Azol-Derivate abgetötet wird, kommt es häufig zu Rezidiven. Durch Anwendung dieser Antimykotika, insbesondere im Rahmen der Prophylaxe, kommt es zu einem großen Eintrag dieser Verbindungen in die Umwelt, so dass möglicherweise auch Resistenzen bei anderen Pilzen induziert werden können. Ferner wird durch den Einsatz von Antimykotika die Hautflora gestört, da *Malassezia*-Hefen, wie auch viele andere, zur residenten Flora des Menschen gehören.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche dienten in erster Linie einem ersten Überblick bei der Suche nach potentiellen Stoffen für eine Hemmung der TAM 1. Diese Form der Therapie stellt eine neue, vielversprechende Möglichkeit dar, die Pityriasis versicolor zu behandeln und gleichzeitig die Nebenwirkungen auf die Hautflora gering zu halten.

In einer ersten Untersuchung wurden verschiedene aus der Literatur bekannte Transaminase Inhibitoren auf ihr Potential hin getestet, die Aktivität der TAM 1 zu unterdrücken. Mit einem Screening mittels eines Agardiffusionstests auf Pigmentinduktionsagar mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle wurden vier Substanzen gefunden, die die Pigmentbildung vollständig hemmen. Diese vier Substanzen sind Aminooxyacetat, Cycloserin, Terizidon (ein Kondensationsprodukt von Cycloserin) und Homoserin.

Bei einem identischen Versuch, durchgeführt auf modifiziertem Dixon Agar (einem Agar mit mehreren Stickstoffquellen) konnte keine Wachstumshemmung des Pilzes beobachtet werden. Dies zeigt, dass die

Substanzen nicht antimyzetisch wirken d.h. den Pilz abtöten, sondern nur spezifisch die TAM 1 hemmen.

In einem Plattenverdünnungstest mit einer linearen Verdünnungsreihe konnte die Stärke der Hemmwirkung der vier verschiedenen Substanzen ermittelt werden. Aminooxyacetat zeigte sich hierbei als stärkster Hemmstoff, der schon ab einer Konzentration von etwa 15 mM in chemisch reinem Wasser vollständig die Pigmentbildung hemmt. Terizidon erwies sich in diesen Testansätzen mit einer Hemmkonzentration von 30 mM ebenfalls als sehr guter Hemmstoff und Cycloserin mit 125 mM als guter Hemmstoff.

Es muss bei diesem Vergleich allerdings berücksichtigt werden, dass die verfügbare Darreichungsform von Terizidon nur schwer im Versuchsmedium löslich ist, was zumindest in geringem Maße das Ergebnis verfälschen könnte. Bei Homoserin konnten wir feststellen, dass es sich bei diesem Stoff vermutlich um einen kompetitiven Hemmstoff mit instabiler Hemmung handelt. Bei einem erneuten Angebot von Tryptophan kommt es zu einer Pigmentbildung. Die Durchführung weiterer Versuche mit Homoserin erscheint wenig sinnvoll, da kein ausreichendes Potential für die Nutzung als Therapeutikum bewiesen werden konnte.

Wie schon in der Einleitung ausführlich erläutert, handelt es sich bei Aminooxyacetat um ein Aminosäure-Analog. Die in der Literatur beschriebene starke Modulation der Transaminase-Inhibition konnte auch in unseren Versuchen gezeigt werden. Es liegt Nahe, dass das reaktive Zentrum der TAM 1 irreversibel besetzt wird. Genauere Untersuchungen hierzu werden erst nach vollständiger Aufklärung der Struktur der TAM 1 möglich sein. Aminooxyacetat zeigt bei allen Versuchen eine sehr starke Hemmung der Pigmentbildung - ein Vorteil bei der möglichen Anwendung als Therapeutikum, da nur eine geringe Menge an Hemmstoff erforderlich sein würde, um die Pigmentbildung zu verhindern. Problematisch bei der Erforschung dieser Substanz ist, dass sie nicht bereits in Form eines Medikaments auf dem Markt

zugelassen ist und aufgrund fehlender toxikologischer Daten keine Heilversuche mit diesem Wirkstoff vorgenommen werden konnten.

Bei der quantitativen Bestimmung der Pigmentbildung bzw. der Hemmung mittels Photometrie ergaben sich Probleme. Der Wellenlängenscan zeigte bei allen Ansätzen ein Extinktionsmaximum im nicht sichtbaren Bereich (unter 400 nm). Ein Extinktionsmaximum war nicht eindeutig bestimmbar. Die abgeleitete Methode der Integralbildung nach Barchmann (Barchmann et al., 2009) ist bei diesen Werten methodisch fraglich, da die Scheitelpunkte außerhalb des Koordinatensystems liegen. Zudem können bei einem Wellenlängenscan verschiedene Extinktionsmuster mit gleichem Integral vorkommen. Die Aussagekraft über die Konzentration des Mediums ist deshalb mit dieser Methode nicht eindeutig. Es wurde daher ein Einzelwellenlängenscan bei 600 nm (in der Mitte des sichtbaren Bereiches) durchgeführt. Anhand dieser Graphen kann man ablesen, was visuell auch eindeutig zu bestimmen ist, nämlich die deutliche Zunahme der Braunfärbung bei den Kontrollversuchen ohne Hemmstoff und eine Hemmung der Pigmentbildung bei den Versuchen mit Hemmstoff. Um genaue Werte zu ermitteln bräuchte man zumindest den Extinktionskoeffizienten eines bekannten Stoffes, um damit einen Wellenlängenscan durchführen zu können.

In den Versuchen mit Flüssigmedium konnte gezeigt werden, dass die Hemmwirkung von der Anzahl der Pilze abhängig ist. Bei den Versuchen mit Cycloserin (0,2 molar) und einer Zellzahl von 500.000 Zellen/µl Flüssigmedium trat keine eindeutige Hemmwirkung ein. In allen Proben bildeten sich Pigmente aus, was zu einer Braunfärbung führte. Vermutlich produzierten die Zellen zu viel TAM 1, so dass keine eindeutige, mit dem Auge sichtbare Hemmwirkung eintreten konnte. Lediglich die Extinktionskurve ließ eine leichte Hemmung vermuten. Bei dem zweiten Versuch mit reduzierter Zellzahl (300.000 Zellen/µl Flüssigmedium) konnte eine deutliche und schon mit dem

bloßen Auge erkennbare Hemmung erzielt werden. Die Ansätze mit Cycloserin blieben farblos. Dies Ergebnis wurde auch durch die Photometrie bestätigt. Dieser Versuch verdeutlicht wie wichtig es ist, die Menge der von einer Pilzzelle produzierten TAM 1 zu kennen, um die Hemmstoffmenge für die Therapie anzupassen.

Für die Versuche mit Cycloserin wurde im Agardiffusionstest sowohl das D-Cycloserin, als auch das L-Cycloserin getestet, beide Enantiomere zeigten eine deutliche Hemmung. Die weiteren Versuche wurde mit D-Cycloserin durchgeführt, da es zum einen wesentlich kostengünstiger ist, zum anderen in den USA und in Großbritannien als Medikament zugelassen und dort zur Behandlung der Tuberkulose eingesetzt wird. Somit konnte nach Rücksprache mit der zuständigen Ethikkommission eine begrenzte Zahl von Heilversuchen an Patienten durchgeführt werden. Die ausgewählten Patienten litten an einer häufig rezidivierenden Form der PV und fühlten sich mit den verfügbaren Therapien nicht ausreichend behandelt. Sie wurden schriftlich über Art und Ziel des Heilversuches aufgeklärt und der Therapieverlauf sowohl von Seiten des Patienten (Therapietagebuch) als auch von Seiten des Behandlers (mit zusätzlicher Fotodokumentation) festgehalten.

Mit der Anwendung von Cycloserin konnte bei diesen Heilversuchen erstmalig der Erfolg der Transaminase-Hemmung am Patienten gezeigt werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung des Tryptophan abhängigen Stoffwechselweges in der Pathogenese der Pityriasis versicolor und zeigt einen neuen Ansatzpunkt für die Therapie und Prophylaxe der Pityriasis versicolor. Da die Pilze nicht wie bei einem Antimykotikum abgetötet werden, sondern nur eine Hemmung der Transaminase erfolgt, ergibt sich daraus auch kein Eingriff in die physiologische Hautflora.

Eine schnelle und wirksame Therapie ist gerade vor dem Hintergrund wichtig, dass eine therapeutische Intervention nicht mehr möglich ist, sobald sich tryptophanabhängige Stoffwechselprodukte gebildet und ihre pharmakologische Wirkung entfaltet haben. Genau wie durch Antimykotika ist auch die Therapie der PV alba mit der Cycloserin-Lösung wirkungslos. Dies konnte bei Patienten, die bereits eine PV alba mit negativem Nativpräparat entwickelt haben, gezeigt werden. Es ergibt sich keine Veränderung des klinischen Bildes.

Deutlich hingegen ist die Veränderung bei den Patienten mit der hyperpigmentierten Form der PV und mit positivem Nativpräparat. Die Patienten berichteten alle über eine deutliche Verbesserung der Läsionen schon ab dem zweiten Tag der Anwendung; nach dem dritten Behandlungstag waren die Läsionen komplett verschwunden. Auch bei Kontrollen nach vier und nach acht Wochen nach Therapiebeginn stellten sich bei den Patienten keinerlei Rezidive ein. Die Patienten äußerten sich allesamt positiv über die Behandlung und die Anwendung mit der Cycloserin-Lösung.

Bei Patient 7 ergab sich allerdings eine Unstimmigkeit. Dieser Patient zeigte im Nativpräparat deutlich eine „Spaghetti mit Fleischklößchen-Struktur“. Das bedeutet, die PV befindet sich laut Nativpräparat in der aktiven Form. Im klinischen Erscheinungsbild sind die Läsionen auf seiner Haut weiß. Dies spricht für eine PV alba. Zum anderen nahm der Patient zum Zeitpunkt der Therapie ein Cortison-Präparat ein, weil er unter einem akuten Schub von Morbus Crohn litt. Ob dieses Präparat eine Wechselwirkung mit Cycloserin verursachte und deshalb die Behandlung erfolglos blieb, muss in weiteren Studien untersucht werden. Ferner wäre es möglich, dass sich auf eine bereits eingetretene PV alba ein erneuter Schub einer Pityriasis versicolor aufgesetzt hat. Dies unterstreicht auch die Bedeutung einer prophylaktischen Anwendung eines solchen Transaminaseinhibitors.

Bei allen Heilversuchen wurde eine 0,2 molare Cycloserin-Lösung verwendet. Da die von der hauseigenen Apotheke hergestellte Lösung aus einer wässrigen Basis besteht und keinerlei Trägersubstanzen, Konservierungsstoffe oder ähnliches enthält, kann davon ausgegangen werden, dass der verwendete Wirkstoff Cycloserin zu einer Besserung der Läsionen führte. In einer aktuellen Studie von Wahab wurde gezeigt, dass die Effektivität einer Einzeldosis (400mg) Itraconazole verglichen mit einer sieben täglichen Anwendung (täglich 200 mg) identisch ist. Aufgrund der deutlich geringeren Kosten und der verbesserten Patientencompliance ist die Einzeldosis vorzuziehen (Wahab et al., 2010). Da der Wirkungseintritt durch das Cycloserin bei unseren Versuchen sehr schnell einsetzte, wäre auch eine noch geringere Dosierung und kürzere Anwendungsdauer des Cycloserins denkbar. Diese Hypothese müsste in einer weiteren klinischen Studie überprüft werden.

Die in vitro Versuche wurden an *Malassezia furfur* CBS 1878 durchgeführt. Um einen Überblick zu erlangen, wie die verschiedensten *Malassezia*-Arten auf die Hemmstoffe reagieren, wurden sie mit den bekannten Hemmstoffen getestet. Bei der *Malassezia furfur* -Gruppe bildeten die Spezies *Malassezia furfur* CBS 4167 und CBS 4170 kein Pigment, eine Hemmwirkung von Aminooxyacetat und Cycloserin konnte nicht untersucht werden. Die Spezies *Malassezia furfur* CBS 5332, CBS 5334 und CBS 6094 und *Malassezia sympodialis* CBS 7222, CBS 7979 und ATCC 42132 wuchsen nicht auf dem Agar, so dass ebenfalls keine Hemmwirkung untersucht werden konnte. Alle anderen *Malassezia furfur*-Stämme (siehe Tabelle 11) wiesen ein ausgesprochen gutes Wachstum auf, bildeten Pigmente und zeigten eine deutliche Hemmung auf Cycloserin und Aminooxyacetat. Dieser Versuch diente allein der Einschätzung, wie die anderen *Malassezia*-Stämme auf die

Hemmstoffe reagieren, so dass von mehreren Versuchsdurchgängen abgesehen werden konnte.

Ebenso einer solchen Orientierung galten die Versuche mit *Candida* Hefen. Seit dem Jahr 2007 ist bekannt, dass die Hefen *Candida glabrata* ebenso wie die *Malassezia furfur* Stämme Indol-Pigmente produzieren (Mayser et al., 2007). Alle untersuchten *Candida glabrata* Stämme zeigten in den durchgeführten Versuchen eine Hemmung auf die getesteten Stoffe. Auch einige andere *Candida* Stämme, wie *Candida pararugosa*, *Candida magnoliae* und *Candida norvegica* zeigten eine Hemmung der Pigmentbildung. Diese Ergebnisse lassen sich ebenso wie die Ergebnisse aus den oben beschriebenen *Malassezia furfur* Spezies versus Spezies Versuchen nur orientierend verwenden. Bei Wiederholungen kam es teilweise zu abweichenden Resultaten, was nicht weiter kritisch zu bewerten ist, da lediglich gezeigt werden sollte, dass auch bei *Candida* Stämmen, die Indol-Pigmente produzieren, ebenfalls eine Hemmung dieser Pigmentbildung möglich ist.

Im nächsten Schritt für die Fortführung der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen muss herausgefunden werden, welche Menge TAM 1 eine *Malassezia furfur*-Zelle produziert und wie die Struktur des Enzyms geartet ist. Das Gen welches die TAM 1 in *Malassezia furfur* kodiert, konnte mittlerweile dargestellt werden, das Protein wird derzeit experimentell in *E. coli* exprimiert. Am reinen Protein könnten Funktion, sowie die Dosis-Wirkungsbeziehung der Hemmstoffe und ihre Wirkweise untersucht werden. *Malassezia globosa* wird in einigen Studien derzeit als der Haupterreger der Pityriasis versicolor angesehen (Crespo-Erchiga et al., 2006; Giusiano et al., 2010), allerdings ist die Tryptophan-abhängige Pigmentbildung in dieser Spezies bisher noch nicht nachgewiesen worden (Lang et al., 2010). In einer aktuellen Studie verglichen Lang et al. die Gene von *Malassezia globosa* und *Malassezia furfur*. Die Autoren fanden heraus, dass zwischen den Genen von

Malassezia globosa und den Genen, die *Malassezia furfur* während der Pigmentproduktion bildet, weite Übereinstimmungen vorliegen (Lang et al., 2010).

Für nachfolgende Versuche ist auch die Löslichkeit der einzelnen Wirksubstanzen in Zusammenarbeit mit der herstellenden Apotheke zu optimieren. Gerade Terizidon, das in Deutschland auch als Medikament zugelassen ist und in den in vitro Versuchen eine gute Hemmwirkung erzielte, ließ sich nur schwer in einer Flüssigkeit lösen. Ebenso müsste man für Aminoxyacetat, die Substanz mit dem größten Hemmpotential in dieser Arbeit, einen Weg finden, um auch mit diesem Stoff klinische Versuche durchführen zu können. Mögliche Konzepte könnten mit der zuständigen Ethikkommission entwickelt werden. Können diese Voraussetzungen erfüllt werden, sollte eine klinische Studie mit Cyclostin, Terizidon und Aminoxyacetat folgen, die in vivo die Substanzen miteinander vergleicht. Weiterhin muss die Anwendungshäufigkeit und die Dosis für die klinische Anwendung optimiert werden.

Als vielversprechenden Ausblick wäre es für die Zukunft denkbar, ein Shampoo mit einem Hemmstoff zu versetzen, das die Patienten täglich anwenden können, um die Pityriasis versicolor zu behandeln und gleichzeitig einem Rezidiv vorzubeugen. Dies gilt insbesondere im Sommer, wenn die Prädispositionsfaktoren, wie z. B. Schwitzen besonders ausgeprägt sind.

Die eingangs gestellten Fragen:

- gibt es einen oder mehrere Transaminaseinhibitoren, die spezifisch die Tryptophan-Aminotransferase 1 (TAM 1) hemmen und
- können ggf. diese Inhibitoren wirkungsvoll zur Behandlung und Prophylaxe der Kleienflechte eingesetzt werden?

sind daher wie folgt zu beantworten:

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass es Verbindungen gibt, welche die TAM 1 spezifisch hemmen können. Diese Verbindungen sind die Aminosäureanaloga Aminooxyacetat und Cycloserin sowie dessen Kondensationsprodukt Terizidon. Der therapeutische Vorteil dieser Stoffe ist, dass sie nicht antimykotisch wirken und demnach nicht die physiologische Hautflora beeinträchtigen, sondern die Pigmentbildung verhindern, indem vermutlich das reaktive Zentrum der TAM 1 irreversibel besetzt wird.

Die klinischen Untersuchungen mit topisch aufgetragenen Cycloserin an Probanden mit Pityriasis versicolor konnten bestätigen, dass die Pigmentbildung mit diesem Medikament wirkungsvoll behandelt werden konnte.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung von Transaminaseinhibitoren auf die Pigmentbildung von *Malassezia furfur*. Das Phänomen der Pigmentbildung von *Malassezia furfur* durch Verstoffwechselung der Aminosäure Tryptophan, wenn diese als alleinige Stickstoffquelle vorhanden ist, wurde 1998 erstmalig beschrieben (Mayser 1998). Diese Pigmente können verschiedene klinische Ausprägungen der Pityriasis versicolor verursachen, die eine häufige *Malassezia* assoziierte Erkrankung darstellt.

Als Grundlagen dieser Arbeit dienten die Untersuchungen an dem verwandten Organismus *Ustilago maydis*, die gezeigt haben, dass zur Biosynthese dieser Vielzahl von komplexen Indolderivate aus Tryptophan nur ein einziger enzymatisch katalysierter Schritt notwendig ist (Zuther et al., 2008). Dieser Schritt, die Desaminierung von Tryptophan zu Indolpyruvat, wird in *Ustilago maydis* von der Tryptophan-Aminotransferase TAM 1 katalysiert. Dies zeigt, dass die TAM 1 für die tryptophanabhängige Pigmentbildung verantwortlich ist. Ein ähnliches Enzym wurde auch in *Malassezia*-Hefen gefunden. Die Überlegung bei dieser Arbeit war nun, ob durch den Einsatz eines Tryptophan-Aminotransferase-Inhibitors die Pigmentbildung von *Malassezia furfur* unterbunden werden kann.

In einer ersten Untersuchung wurden die verschiedensten Transaminase-Inhibitoren auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Aktivität der TAM 1 zu unterdrücken. In einem Agardiffusionstest auf Pigmentinduktionsagar mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle wurden vier Substanzen gefunden, die die Pigmentbildung vollständig unterdrückten. Diese vier Substanzen sind

Aminooxyacetat, Cycloserin, Terizidon (ein Kondensationsprodukt von Cycloserin) und Homoserin. Bei identischen Testreihen, durchgeführt auf modifiziertem Dixon Agar (einem Agar mit mehreren Stickstoffquellen), konnte keine Wachstumshemmung des Pilzes beobachtet werden. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die Substanzen nicht antimyzetisch wirken und den Pilz abtöten, sondern nur spezifisch die TAM 1 hemmen.

In einem Plattenverdünnungstest mit einer linearen Verdünnungsreihe konnte die Hemmwirkung quantitativ näher umgrenzt werden. Aminooxyacetat erwies sich in dem gewählten Versuchsansatz als stärkster Hemmstoff, der schon ab einer Konzentration von etwa 15 mM in chemisch reinem Wasser vollständig die Pigmentbildung hemmt. Cycloserin und Terizidon erwiesen sich ebenfalls als sehr gute Hemmstoffe, mit einer Konzentration von 125 mM (Cycloserin) bzw. 30 mM (Terizidon). Bei Homoserin war festzustellen, dass es sich bei diesem Stoff vermutlich um einen reversibel kompetitiv wirksamen Hemmstoff handelt. Das bedeutet, die Hemmung ist nicht stabil, bei einem erneuten Angebot von Tryptophan kommt es zu einer Pigmentbildung. Aus diesem Grunde wurden die Versuche mit Homoserin nicht weitergeführt.

In einer off-label Anwendung wurden nach erfolgter Aufklärung, in Absprache mit der Ethikkommission und schriftlichem Einverständnis, Patienten mit Pityriasis versicolor mit einer steril-filtrierten, wässrigen, auf pH 7 gepufferten D-Cycloserinlösung (0,2 M) behandelt. Jeder Patient erhielt 50 ml dieser Lösung zur zweimal täglichen Anwendung über 5 Tage im Bereich der Läsionen. Bei den Patienten mit hyperpigmentierter, im Nativpräparat positiver PV heilten die Veränderungen vollständig innerhalb von 3 - 5 Tagen ab. Bei den Patienten mit einer PV alba setzte keine Besserung ein.

Die Ergebnisse zeigen deutlich das therapeutische Potenzial einer Hemmung der TAM 1 zur Therapie und Prophylaxe der PV und geben zudem Einblicke in

die mögliche Pathophysiologie dieser häufigen Erkrankung. Zum ersten Mal konnte damit gezeigt werden, dass topische Transaminaseinhibitoren wie Cycloserin einen raschen und positiven Effekt auf das klinische Erscheinungsbild der PV haben können. Denkbar als ein neuer therapeutischer Ansatz für die Therapie und Prophylaxe der PV wäre die topische Anwendung des Präparates z. B. in Form eines Shampoos, das vorbeugend täglich von diesen Patienten anzuwenden ist, um ein Rezidiv zu verhindern und der Depigmentierung vorzubeugen. Dies eröffnet möglicherweise einen spezifischeren Ansatz für die Prophylaxe und Therapie der PV als eine herkömmliche antimykotische Therapie.

7 SUMMARY

The aim of the current study was to investigate the effectiveness of transaminase inhibitors in preventing pigmentation of *Malassezia furfur*. For the first time Mayser 1998, described that Tryptophan metabolized by *Malassezia furfur* lead to pigmentation, when present as a sole nitrogen source (Mayser 1998). These pigments could result in various clinical expressions of Pityriasis versicolor, which represents a common *Malassezia* associated disease.

This study is based on investigations of the phylogenetical closely related organism *Ustilago maydis*. Recently Zuther et al. showed that the biosynthetic pathway leading to complex indol-derived pigment production from tryptophan is catalyzed by a single enzyme called TAM 1 (Zuther et al., 2008). TAM 1 is a Tryptophan-aminotransferase, converting tryptophan to Indolpyruvate, thus playing a key role in tryptophan induced pigmentation. A similar enzyme was found in *Malassezia* species. The hypothesis of this study was that by using a tryptophan-aminotransferase-inhibitor, pigment formation of *Malassezia furfur* can be suppressed.

In a first investigation with an agar diffusion method based on pigment-inducing agar and tryptophan as a sole nitrogen source, four compounds completely inhibiting pigmentation were discovered: Aminooxyacetate, Cycloserine, Terizidon (a condensate of Cycloserine) and Homoserine. The confirmation that the alleged anti pigmentation effect is based on the specific inhibition of TAM 1 and not on a possible antimycotic activity was performed with modified Dixon agar. This medium with a broad spectrum of nitrogen

sources showed no growth inhibition in the otherwise identically performed experiment.

A linear agar dilution test helped to quantify the inhibition effect. Aminoxyacetat was found to be the strongest inhibitor, capable of inhibiting the pigment formation completely at a concentration of approximately 15 mM in chemically pure water. Cycloserine and Terizidon also proved to be very good inhibitors at concentrations of 125 mM (Cycloserine) and 30 mM (Terizidon). It was however determined that Homoserine serves as a reversible competitive inhibitor with unstable inhibition, implying that after additional supply of tryptophan, pigment formation would occur. Based on this finding, the investigations with Homoserine were discontinued.

In agreement with the local ethical committee and after informed written consent, an off-label use was performed with patients suffering from PV. PV was treated with a sterile-filtered, buffered aqueous solution containing D-Cycloserine (0,2 M). After informed consent each subject received 50 ml of the solution to be applied to the lesions twice daily for five days. In patients with proven hyperpigmented PV-lesions, lesions were completely cured after 3-5 days. On the other hand, no effects were evident in patients with PV alba.

The results of the current study point at the therapeutic potential of TAM 1 inhibition for the treatment and prophylaxis of PV and also adds to the understanding of the possible pathophysiology of this frequent disease.

For the first time, an imposing effect of a topically applied transaminase inhibitor on the clinical course of Pityriasis versicolor could be demonstrated. The topical application of transaminase inhibitors could prove itself as a new therapeutic approach for the treatment and prophylaxis of Pityriasis versicolor on daily bases e.g. as shampoo, preventing the recurrence and

depigmentation. Our results also underline the importance of the tryptophan-derived metabolic pathway in the pathogenesis of Pityriasis versicolor. This could help to develop a new therapeutic approach in the therapy and prophylaxis of Pityriasis versicolor, based on a completely different and more specific approach in treatment than the commonly applied antimycotic therapy.

8 LITERATUR

1. ACOSTA, M.E., CAZORLA, D. Aspectos clinico-epidemiologicos de la pitiriasis versicolor en una comunidad pesquera de la region semiarida del Estado de Falcon, Venezuela. Rev Iberoam Micol., 21:191-4, 2004.
2. AHTONEN, P., LEHTONEN, O.P., KERO, P., TUNNELA, E., HAVU, V. Malassezia furfur: Colonization of neonates in an intensive care unit. Mycoses 33: 543-547, 1990.
3. BARCHMANN, T., HORT, W., KRÄMER, H.J., MAYSER, P. Glycine as a regulator of tryptophan-dependent pigment synthesis in Malassezia furfur, Mycoses.,2009 Aug 21. [Epub ahead of print], 2009
4. BARNES, W.G., SAUER, G.C., ARNOLD, J.D. Scanning electron microscopy of tinea versicolor organism (Malassezia furfur = Pityrosporum orbiculare?) Arch. Derm. 107: 392-394, 1973.
5. BORELLI, D., JACOBS, P.H., NALL, L. Tinea versicolor: epidemiological, clinical and therapeutic aspects. J. Am. Acad. Dermatol. 25: 300-305, 1991.
6. BRITTON, G. The biochemistry of natural pigments, Camebridge University Press, 1.Auflage, 1983.
7. BURKE, R.C. Tinea versicolor: susceptibility factors and experimental infections in human beings. J. Invest. Dermatol. 36: 389-401, 1961.
8. CHETTY, G.N., KAMALAM, A., THAMBIAH, A.S. Pityriasis versicolor - a study of 200 cases in atropical skin clinic. Mykosen 22: 234-246, 1979.
9. CRESPO-ERCHIGA, V. DELGADO-FLORENCIO, V. Malassezia yeasts and pityriasis versicolor Curr Opin Infect Dis 19:139-147, 2006.
10. de ALMEIDA, JR H., Absence of sunburn in lesions of pityriasis

- MAYSER, P. versicolor alba. *Mycoses*, 49:516, 2006
11. de LUCA, C.,
PICARO, M.,
BREATHNACH, A. Lipoperoxidase activity of *Pityrosporum*: characterisation of by-products and possible role in pityriasis versicolor. *Exp Dermatol* 5: 49-56, 1996
 12. de QUINZADA, M. Estudio de las especies de *Malassezia* relacionadas con la patología cutánea pitiriasis versicolor en Panamá. Tesis Doctoral, Panamá, 2005.
 13. DELESCLUSE, J. Itraconazole in tinea versicolor: a review. *J Am Acad Dermatol* 23:551–554, 1990.
 14. EICHSTEDT, C.F. Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. *Froriep's Neue Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde* 853, 270-271, 1846.
 15. EL-HEFNAWI, H.,
EL-GOTAMY, Z.,
REFAI, M. Studies on pityriasis versicolor in Egypt. *Cinical and therapeutic*. *Mykosen* 14: 483-490, 1971.
 16. FAERGEMANN, J.,
FREDRIKSSON, T. Propylene glycol in the treatment of pityriasis versicolor. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 60:92-93, 1980.
 17. FARSCHIAN, M.,
YAGHOUBI, R.,
SAMADI, K. Fluconazole versus ketoconazole in the treatment of tinea versicolor. *J.Dermatol Treat* 13:73-76, 2002.
 18. FERIÉ, J.,
DINKELA, A.,
MBATA, M. Skin disorders among school children in rural Tanzania and an assessment of therapeutic needs. *Tropical Doctor* 36:219-221, 2006.
 19. FISHER, M.,
HAGEN, D.,
COLVIN, B. Aminoxyacetic Acid: Interactions with Gamma-Aminobutyric Acid and the Blood-Brain Barrier, *Science*, Vol.153. no. 3744, pp. 1668-1670, 1966.
 20. FRITSCH *Dermatologie Venerologie*, 2. Auflage 2004, Springer Medizin Verlag.
 21. GARCÍA-HUMBRÍA L.,
RICHARD-YEGRES N.,
PÉREZ-BLANCO M.,
YEGRES F.,
MENDOZA M., Superficial mycoses: comparative study between type 2 diabetic patients and a non-diabetic control group. *Invest Clin.*, Mar;46(1):65-74, 2005

- ACOSTA A.,
HERNÁNDEZ R.,
ZÁRRAGA E.
22. GIUSIANO G.,
SOSA M.D.,
ROJAS F.,
VANACORE S.T.,
MANGIATERRA M. Prevalence of *Malassezia* species in pityriasis
versicolor lesions in northeast Argentina.
Rev Iberoam Micol. Mar 24. [Epub ahead of
print] 2010.
 23. GOHLA, C.,
KRÄMER, H.J.,
MAYSER, P. Entwicklung eines Flüssigmediums zur
Pigmentinduktion bei *Malassezia furfur* und
Vergleich verschiedener *Malassezia furfur*
Stämme.
in press, 2008.
 24. GUÉHO, E.,
MIDGLEY, G.,
GUILLLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four
new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 69.
337-355, 1996
 25. GUPTA, A. K.,
BATRA, R.,
BLUHM, R.,
FAERGEMANN, J. Pityriasis versicolor.
Dermatol. Clin. 21: 413-429, 2003.
 26. GUPTA, A.K.,
BLUHM, R.,
SUMMERBELL, R. Pityriasis versicolor.
JEADV 16: 19-33, 2002.
 27. HAGLER, A.N.,
AHEARN, D.G. Rapid diazonium blue B test to detect
basidiomycetous yeasts.
Int. J. Syst. Bacteriol. 31: 204-208, 1981.
 28. HAY, R. J.,
ROBERTS, S.O.B.,
MACKENZIE, D.W.R. Pityriasis versicolor, (S.1176-1178), In:
Textbook of Dermatology (Rook, A. J.,
Wilkinson, D. S., Ebling, F. J. G., eds) Vol.2,
5th edn., Oxford: Blackwell, 1992.
 29. HELLGREN, L.,
VINCENT, J. The incidence of tinea versicolor in central
Sweden.
J Med Microbiol., 16:501-2. 1983
 30. HOFMANN, S.,
POLLACK, M.,
OTTO, M. Augmentation Treatment of Psychotherapy for
Anxiety Disorders with D-Cycloserine.
CNS Drug Reviews, Vol. 12, No. 3-4, 2006.
 31. HORNER, W. E., Fungal allergens.

- HELBLING, A.,
SALVAGGIO, J.E.,
LEHRER S. B.
Clin. Microbiol. Rev. 8 (2): 161-179, 1995.
32. HORT W.,
LANG S.,
BRUNKE S.,
MAYSER P.,
HUBE B.
Analysis of differentially expressed genes associated with tryptophan-dependent pigment synthesis in *M. furfur* by cDNA subtraction technology. Med Mycol. 2009 May;47(3):248-58. Epub 2008 Jul 24. 2009
33. INGORDO, V.,
NALDI, L.,
COLECCHIA, B.
Prevalence of pityriasis versicolor in young Italian sailors. Br J Dermatol 149:1270-1272, 2003.
34. IPAKTCHI, R.
Der Einfluß von Metaboliten auf die Proliferation von Novikoff-Hepatoma Tumorzellen: eine in vivo Untersuchung an CD Ratten, Dissertation 2005.
35. JACOBS, P.H.
Evolution in treatment of pityriasis versicolor. In: Meinhof W. Oral therapy n dermatomycoses: a Stepp forward. Oxford Med Publish Found, pp 107-110, 1985
36. JELLIFFE, D.B.,
JACOBSON, F.W.
The clinical picture of tinea versicolor in Negro infants. J Trop Med Hyg. 1954 Dec;57(12):290-2, 1954
37. JENA, D.K.,
SENGUPTA, S.,
DWARI, B.C.
Pityriasis versicolor in the pediatric age group. Indian J Dermatol Venereol Leprol 71:259-261, 2005.
38. JUNTACHAI W.,
OURA T.,
MURAYAMA S.Y.,
KAJIWARA S.
The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. Med Mycol. 2009;47(5):477-84.2009
39. KATSAMBAS, A.,
RIGOPOULOS, D.,
ANTONIOU, C.
Econazole 1% shampoo versus selenium in the treatment of tinea versicolor: a single-blind randomized clinical study. Int J Dermatol 35:667-668, 1996.
40. KRÄMER, H.J.,
KESSLER, D.,
HIPLER, U.C.,
Pityriarubins, novel highly selective inhibitors of respiratory burst from cultures of the yeast *Malassezia furfur*: comparison with the

- IRLINGER, B.,
HORT, W.,
BÖDEKER, R.H.,
STEGLICH, W.,
MAYSER, P.
41. LANG S.K.,
HORT W.,
MAYSER P.
42. LYNFIELD, Y.L.
43. MACHOWINSKI, A.,
KRÄMER, H.J.,
HORT, W.,
MAYSER, P.
44. MARPLES, M.J.
45. MAYSER, P.,
LANG, S.,
HORT, W.
46. MAYSER, P.,
SCHÄFER, U.,
KRÄMER, H.J.,
IRLINGER, B.,
STEGLICH, W.
47. MAYSER, P.,
WILLE, G.,
ONKAMPE, A.,
THOMA, W.,
ARNOLD, N.,
MONSEES, T.
48. MELLEN, L.A.,
VALLEE, J.,
FELDMAN, S.R.
- bisindolylmaleimide arcyrarubin A.
Chembiochem. Dec;6(12):2290-7. 2005.
- Differentially expressed genes associated with
tryptophan-dependent pigment synthesis in
Malassezia furfur- a comparison with the
recently published genome of *Malassezia*
globosa.
Mycoses. 2010 Feb 24. [Epub ahead of
print],2010
- Skin diseases in twins, Arch Dermatol.
Nov;110(5):722-4. 1974
- Pityriacitrin--a potent UV filter produced by
Malassezia furfur and its effect on human skin
microflora.
Mycoses, 49(5):388-92, 2006.
- The genus *Pityrosporum*, In: The Ecoogy of
the hman skin, Springfield: C. C. Thomas,
pp.408-422, 1965.
- Pathogenicity of *Malassezia* Yeasts
In: Brakhage A, Zipfel P: Human and animal
relationships: the Mycota VI; 2. Aufl., S. 115 -
154; 2008.
- Pityriacitrin -- an ultraviolet-absorbing indole
alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*.
Arch Dermatol Res.; 294(3):131-134. 2002.
- Synthesis of fluorochromes and pigments in
Malassezia furfur by use of tryptophan as
single nitrogen source.
Mycoses 41:265-271, 1998.
- Treatment of pityriasis versicolor in the United
States.
J Dermatol Treatment. 15:189-192, 2004.

49. MIRANDA, K.C.,
RODRIGUES DE ARAUJO, C.,
SOARES, A.J. Identificação de espécies de *Malassezia* em
pacientes com pitíriase versicolor em Goiânia-
GO.
Rev Soc Bras Med Trop 39:582-583, 2006.
50. MITTAG, H. Fine structural investigation of *Malassezia*
furfur. I. Size and shape of the yeast cells and
a consideration of their ploidy.
Mycoses 37: 393-399, 1994.
51. MITTAG, H. Fine structural investigation of *Malassezia*
furfur. II. The envelope of the yeast cells.
Mycoses 38: 13-21, 1995.
52. NAZZARO PORRO M.,
PASSI S.,
PICARDO M. Lipoxygenase activity of *Pityrosporum* in vitro
and in vivo. J Invest Dermatol 87: 108-112,
1986
53. NENOFF, P.,
REINL P.,
HAUSTEIN, U.-F. Der Hefepilz *Malassezia*, Erreger,
Pathogenese und Therapie.
Hautarzt 52: 73-86, 2001.
54. NOBLE, W. C. Microbiology of Human Skin. London: Lloyd-
Duke, pp.3-65; 263-268, 1981.
55. OGUNBIYI A.O.,
OMIGBODUN Y.,
OWOAJE E. Prevalence of skin disorders in school children
in southwest Nigeria. Int J Adolesc Med
Health. Apr-Jun;21(2):235-41, 2009
56. PARISIS, N.,
STRATIGOS, J.,
MARCELOU-KINTI, U.,
CAPETANAKIS, J. Pityriasis versicolor in Griechenland und ihre
Prädispositions-faktoren.
Hautarzt 28: 589-592, 1977.
57. PSCHYREMBEL Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, 1998,
de Gruyter Verlag Berlin.
58. RAZACK, E. M. A.,
THAMBIAH, A. S. A clinical study pityriasis versicolor in Madras.
Sabouraudia 15: 305-311, 1977.
59. RAZANAKOLONA, I.,
RAKOTOZANDRINDRAINY,
N., RAZAFIMAHEFA, J, Pityriasis versicolor à Antananarivo: première
étude sur l'identification d'espèces de
Malassezia responsables. Abst FSMM. J
Mycol Méd 14:152, 2004.
60. ROBERTS, S. O. B. *Pityrosporum orbiculare*: incidence and
distribution on clinically normal skin. Br. J.
Dermatol. 81: 264-269, 1969.
61. ROBERTS, S.O.B. Pityriasis versicolor: A clinical and mycological
investigation. Br. J. Dermatol. 81: 315-326,

- 1969.
62. RUETE, A.E. Pityriasis versicolor. In: Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten (Hrsg: Jadassohn, J.) Berlin: Springer Verlag, 11. Band, 696-710, 1928.
63. SEELIGER, H.P.R., HEYMER, T. Malassezia furfur (Robin 1853) Baillon 1889. In: Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt. Stuttgart, New York: Thieme, 78-81, 1981.
64. SELLAMI, A., SELLAMI, H., MAKNI, F., MEZGHANI, S., CHEIKH-ROUHO, F., MARREKCHI, S., TURKI, H., AYADI, A. Childhood dermatomycoses study in Sfax hospital, Tunisia. Mycoses 51, 451-454, 2008.
65. SMITH, E.B., GELLERMAN, G.L. Tinea versicolor in infancy. Arch. Derm. 93:362-363, 1966.
66. SVEJGAARD, E. Double blind trial of miconazole in dermatomycosis. Acta Derm Venereol (Stockholm) 53:497-499, 1973.
67. TANENBAUM, L., ANDERSON, C., ROSENBERG, M.J. 1% sulconazole cream v 2% miconazole cream in the treatment of tinea versicolor. A double-blind, multicenter study. Arch Dermatol 120:216-219, 1984.
68. TERRAGNI, L., LASAGNI, A., ORIANI, A. Pityriasis versicolor of the face. Mycoses 34: 345-347, 1991.
69. THOMA, W., KRÄMER, H.-J., MAYSER, P. Pityriasis versicolor alba. JEADV 19: 147-152, 2005
70. THOMA, W., KRÄMER, H.-J., MAYSER, P.: Pityriasis versicolor alba. J. Eur. Acad. Derm. Venerol. 19 (2): 147-152, 2005.
71. WAHAB M.A., ALI M.E., RAHMAN M.H., CHOWDHURY S.A., Single dose (400mg) versus 7 day (200mg) daily dose itraconazole in the treatment of tinea versicolor: a randomized clinical trial. Mymensingh Med J. Jan;19(1):72-6. 2010

- MONAMIE N.S.,
SULTANA N.,
KHONDOKER L.
72. WATSON, G.B.,
BOLANOWSKI, M.A.,
BAGANOFF, M.P.,
DEPPELER, C.L.,
LANTHORN, T.H. D-cycloserine acts as a partial agonist at the glycine modulatory site of the NMDA receptor expressed in *Xenopus* oocytes. In: Brain Res. Feb 26; 510(1):158-60. 1990.
73. WELCH, H. Antibiotics in respiratory infections In: Antibiotic medicine & clinical Therapy, 1(2), 59-63, 1955.
74. WENZEL, M.,
HAASE, G.,
MAYSER, P.,
KRÄMER, H.K.,
SPITELLER, P. Tryptophanabhängige Pigmentbildung bei *C. glabrata*;
Vortrag bei 39. Wissenschaftl. Tagung der DMYKG e.V., Leipzig 2005.
75. WYRE, H.W.,
JOHNSON, W.T. Neonatal pityriasis versicolor. Arch. Derm. 117: 752-753, 1981.
76. YARROW, D.,
AHEARN, D.G. *Malassezia* Baillon. In: The yeasts: A taxonomic study (Kreger van Rij NJW, ed), 3rd edn. Amsterdam, S. 882-5, 1984.
77. ZEIDLER, J.,
LICHTENTHALER, H. K. Regulation und Hemmung der Isoprenemission von Pflanzen, Botanisches Institut II, Universität Karlsruhe 2001.
78. ZUTHER, K.,
MAYSER, P.,
HETTWER, U, W U W,
SPITELLER, P.,
KINDLER, B.L.,
KARLOVSKY, P,
BASSE, C.W.,
SCHIRAWSKI, J. The tryptophan aminotransferase TAM 1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. Mol Microbiol.; 68(1):152-72, 2008.

9 ANHANG

9.1 Rohdaten

Datum	18.05.2009	
Wellenlänge	600λ	
Konz. TRP	30mM	
Anzahl Zellen	300000/μl	
	1. Kontrolle	
	2. +0,2 m Aminooxyacetat	

Zeit

Stunden	1 Kontrolle	2 Aminooxyacetat
0	0,000	0,000
3	0,134	0,016
6	0,169	0,024
24	0,240	0,087

Datum	06.05.2009	
Wellenlänge	600λ	
Konz. TRP	30 mM	
Anzahl Zellen	500000/μl	
	1. Kontrolle ohne Hemmstoff	
	2. +0,5 m Cycloserin	

Zeit

Stunden	1 k	2 c
0	0,000	0,000
6	0,245	0,218
24	0,288	0,269

Datum	13.05.2009
Wellenlänge	600λ
Konz. TRP	30mM
Anzahl Zellen	300000/μl
	1. Kontrollansatz ohne Hemmstoff 2. + 0,5 m Cycloserin

Zeit	
Stunden	1 k
0	0,000
3	0,320
6	0,266
24	0,496

9.2 Einverständniserklärung

Bei Ihnen ist eine Kleinflechte (Pityriasis versicolor) diagnostiziert worden. Wie Sie in einem persönlichen Gespräch mitgeteilt haben, tritt die Erkrankung immer wieder auf und konnte bisher mit Anti-Pilzmitteln nicht sicher behandelt werden. Forschungen in unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass der Pilz einen speziellen Stoffwechselweg aktiviert, der zum Ausbruch der Erkrankung beiträgt. Wir haben Stoffe gefunden, die diesen Stoffwechselweg in besonderer Weise hemmen. In einem Fall handelt es sich Cycloserin, welches in Tablettenform beim Menschen als Tuberkulose-Mittel eingesetzt wird.

Zur Behandlung der Kleinflechte haben wir von diesem Mittel nun eine wässrige Lösung hergestellt, die auf die Haut aufgebracht wird. Zum einen sollen Hautstellen behandelt werden, die bereits von der Erkrankung betroffen sind, andererseits aber auch Stellen, an denen die Erkrankung unter bestimmten Bedingungen wie starken Schwitzen ausbricht. Nach dem Arzneigesetz handelt es sich hierbei um einen sogenannten Heilversuch. Dies bedeutet, dass ein für eine bestimmte Anwendung am Menschen noch nicht zugelassenes Mittel zur Behandlung einer Erkrankung eingesetzt wird.

Ich bin mit einem Behandlungsversuch meiner Kleinflechte mit einer Cycloserin-haltigen Lösung einverstanden. Meine Fragen sind ausreichend beantwortet worden. Mir ist bewusst, dass dieser Wirkstoff nicht speziell zur Behandlung und Vorbeugung der Kleinflechte zugelassen ist. Er ist aber zur Anwendung am Menschen in einer anderen Anwendung in Tablettenform verfügbar. Es werden mir 50 ml einer 0,2 molaren Cycloserin-Lösung zur Verfügung gestellt, von denen ich maximal 10ml am Tag verwende. Sie sollte sonst kühl gelagert werden (4°C im Kühlschrank). Ich trage die Lösung auf die befallenen Stellen nach dem Duschen an insgesamt 5 Tagen nach beigefügter Anleitung auf. Kontrollen erfolgen nach insgesamt 7 und 14 Tagen.

Meine Mitarbeit könnte dazu führen, dass ein neues Medikament entwickelt werden kann, dass die Kleinflechte spezifisch und vorbeugend behandeln hilft.

Ich erkläre mich daher auch damit einverstanden, dass die Behandlungsergebnisse in anonymisierter Form gespeichert und ausgewertet werden, ebenso mit dem Erstellen einer Photodokumentation.

Gießen, den
Unterschrift

9.3 Dokumentationsbogen

Prof. Dr. med. P. Mayser
 Universitätsklinikum Gießen, Zentrum für Dermatologie und Andrologie
 Tel.: +49 641 99 43200
 Fax: +49 641 99 43209
 E-mail: Peter.Mayser@derma.med.uni-giessen.de

Patient

Initialien:

Geburtsdatum:

Anamnese:

Allergien:

Grunderkrankungen:

Medikamente:.....

Seit wann PV:.....

Provokationsfaktoren:.....

Familienanamnese:.....

Einschlusskriterien:

- Alter >18 Jahre
- Pityriasis versicolor

Ausschlusskriterien:

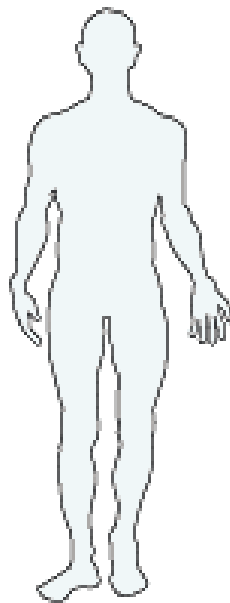
- Frauen, da ggf. Schwangerschaft bestehen könnte
- Allergie gegen Bestandteile
- Systemische Antimykotika < 3 Monate vor Studienbeginn
- Schwere Grunderkrankungen, die die Heilung erschweren (Immunsuppression, Zytostatika, Diabetes, u.a.)

Ausgangsbefund/Screening (Tag 0)

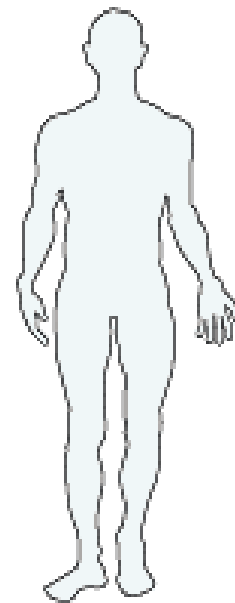
Datum:

1) Areascore

vorn

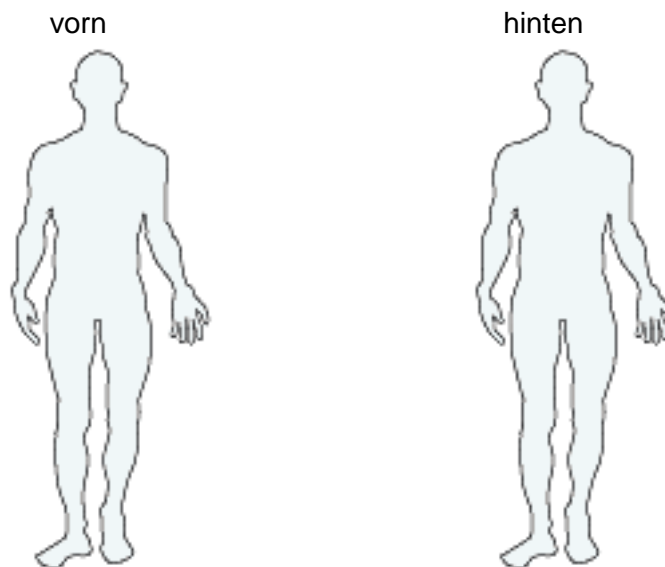


hinten

**2) Photodokumentation****3) Nativpräparat****4) Woodlicht****5) Therapieareal festgelegt und eingezeichnet****6) Informationen mitgegeben**

Klinischer Befund nach 1 Woche und 5-tägiger Therapiephase (d7)

Datum:

1) Areascore**2) Photodokumentation****3) Klinische Beurteilung der umliegenden Haut / Beurteilung der Verträglichkeit und Wirksamkeit**

.....

.....

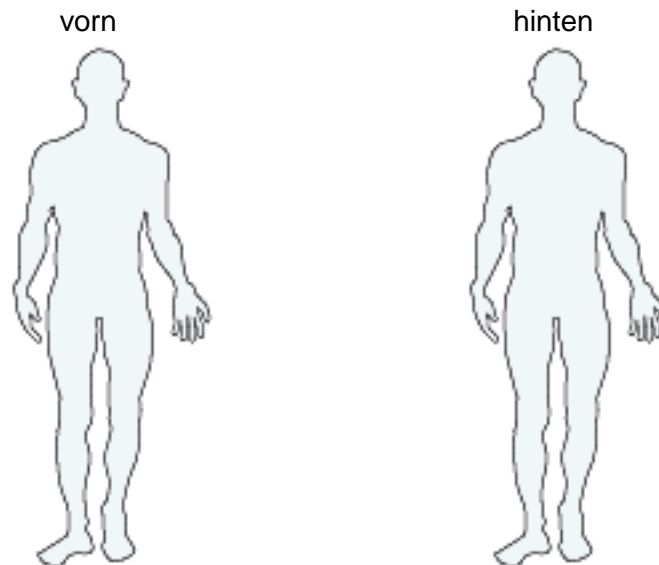
4) Patientenurteil zur Anwendung

.....

.....

Klinischer Befund nach 14 Tagen Therapie (d14)

Datum:

1) Areascore**2) Photodokumentation****3) Klinische Beurteilung der umliegenden Haut / Beurteilung der Verträglichkeit und Wirksamkeit**

.....

.....

4) Patientenurteil zur Anwendung

.....

.....

9.4 Patiententagebuch

Sehr verehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie haben von uns 50 ml einer Lösung zum Einreiben der aufgezeichneten Hautregion erhalten. Die Anwendung sollte 2 x tgl. über 5 Tage erfolgen, morgens und abends nach dem Duschen oder Waschen. Pro Tag sollten nicht mehr als 10 ml verwendet werden. Bitte bewahren Sie die Lösung zwischenzeitlich im Kühlschrank auf.

Notieren Sie bitte in diesem Bogen, wenn Sie Veränderungen an Ihrer Haut feststellen.

Vielen Dank.

Datum der Erstuntersuchung:

Tag	Juckreiz	Rötung	Schuppung	+/- *	Bemerkungen
1					
2					
3					
4					
5					

* Veränderung zum Ausgangsbefund = 0;
 + (max. bis +10) = Verbesserung;
 - (max. bis -10)=Verschlechterung.

Datum des 1. Kontrolltermins:

Datum des 2. Kontrolltermins:

Bitte bringen Sie diesen Bogen und die angebrochene Flasche zu den Kontrollterminen mit!

10 LEBENSLAUF

DER LEBENSLAUF WURDE AUS DER ELEKTRONISCHEN VERSION DER
ARBEIT ENTFERNT.

11 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Mayser für die Überlassung dieses interessanten Themas und die erstklassige und sehr kollegiale Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Frau Anne Gries für ihre zuverlässige Unterstützung bei der Laborarbeit.

Ebenso gilt mein Dank Frau Auringer von der Apotheke für die gute Zusammenarbeit und die schnelle Herstellung der Lösungen.

Die Terizidon-Reinsubstanz wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Alt, Fatol Arzneimittel, Schiffweiler (Betriebsstätte der Riemser AG).

Bedanken möchte ich mich auch bei Ilka Simon für die Anregungen und erheiternden Gespräche während unserer Kaffeepausen.

Herzlich bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meiner Schwester Anja und Simon Nordschild für die Mithilfe bei „chemischen“ Fragen.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Oma und meiner Großtante für die großartige Unterstützung während des Studiums, der Examenszeit und der Promotion bedanken.

Für sein Verständnis, seine Unterstützung und seine große Hilfe beim Korrekturlesen der Arbeit danke ich vor allem meinem Mann Hagen.